

67B
Vol. 23

1956

ARQUIVOS
DO
INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA

SÃO PAULO

BRASIL



Os Arquivos do Instituto Biológico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em número limitado, poderão ser adquiridos ao preço de Cr\$ 2,00 no Serviço de Vendas do Instituto Biológico.

Toda a correspondência referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biológico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 7119, São Paulo, Brasil.

Diretor Geral: Paulo Nóbrega

The "Arquivos do Instituto Biológico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles may be purchased for Cr\$ 2.00 from the Serviço de Vendas of the Instituto Biológico.

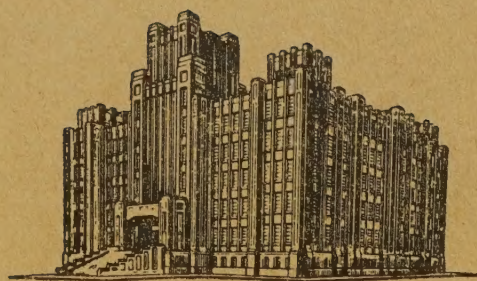
All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biológico, P. O. Box 7119, São Paulo, Brazil.

Vol. 23

1956

ARQUIVOS
DO
INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA

SÃO PAULO

BRASIL

SUMÁRIO

	Pags.
HOMENAGEM PÓSTUMA AO PROFESSOR HENRIQUE DA ROCHA LIMA	V-XXXIV
1. Amaral, S. Franco do — INFESTAÇÃO DAS BROCAS MARÍTIMAS <i>TEREDO</i> SP, <i>BANKIA</i> SP E <i>MARTESIA STRIATA</i> LINNE, EM TACOS DE ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA (BERT) O. KUNTZE, TRATADOS COM INSETICIDAS. Estampas 1 a 5. <i>Attack of the marine borers, Teredo sp, Bankia sp and Martesia striata Linne in pine — wood boards treated with insecticides</i>	1-19
2. Amaral, S. Franco do — EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BHC SOBRE O BICHO MINEIRO "PERILEUCOPTERA COFFEELLA (GUÉRIN-MÉNEVILLE)". Estampas 6 a 9. <i>Effect of different BHC concentrations on the bicho mineiro "Perileucoptera coffeella (GUÉRIN-MÉNEVILLE)"</i>	21-33
3. Garust, A. Tello e Nóbrega, P. — DOENÇA CRÔNICA RESPIRATÓRIA NO BRASIL (SÃO PAULO). Estampa 10. <i>Chronic respiratory disease in Brazil</i>	35-38
4. Nóbrega, P., Trapp, E. E. e Giovannoni, M. — SOBRE A OCORRÊNCIA DE ORNITOSE EM PÁSSAROS. <i>On the occurrence of ornithosis in passerines</i>	39-40
5. Bitancourt, A. A. e Jenkins, A. E. — ESTUDOS SOBRE AS MIRIANGIALES — VIII. A ANTRACNOSE MACULADA DA SERINGUEIRA, CAUSADA POR ELSINÖE — Estampas 11 a 14. <i>Studies in the Myriangiales — VIII. Spot anthracnose of hevea, caused by Elsinoë</i>	41-66
6. Caldas, A. e Machado, L. P. — EMPREGO DO LEITE NA EXECUÇÃO DA PROVA DA FIXAÇÃO DE CASTAÑEDA PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA. <i>Surface fixation method of Castañeda, using the milk, for diagnosis of bovine brucellosis</i>	67-71
7. Castro, M. P. — RETRAÇÃO POR CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DO COAGULO DE PLASMA DE GALINHA. Estampa 15. <i>Retraction of chicken plasma clot by freezing and thawing</i>	73-77

(CONTINUA)

8. **Pereira Junior, J.** — MÉTODO RAPIDO DE LIBERAÇÃO DA MUCILAGEM DO CAFÉ DESPOLDADO PELA ATIVAÇÃO DE SUAS PROPRIAS ENZIMAS.
A method for quick freeing of pulped coffee beans from their mucilage through activation of its own enzymes 79-86

9. **Andrade, A. C., Puzzi, D. e Torres, C. A.** — EXPERIÊNCIAS PARA O CONTRÔLE DAS PODRIDÕES DO ENGAÇO E PEDICÉLO DA BANANA.
Experiments for the control of the stem end rot and finger drop rot of banana 87-100

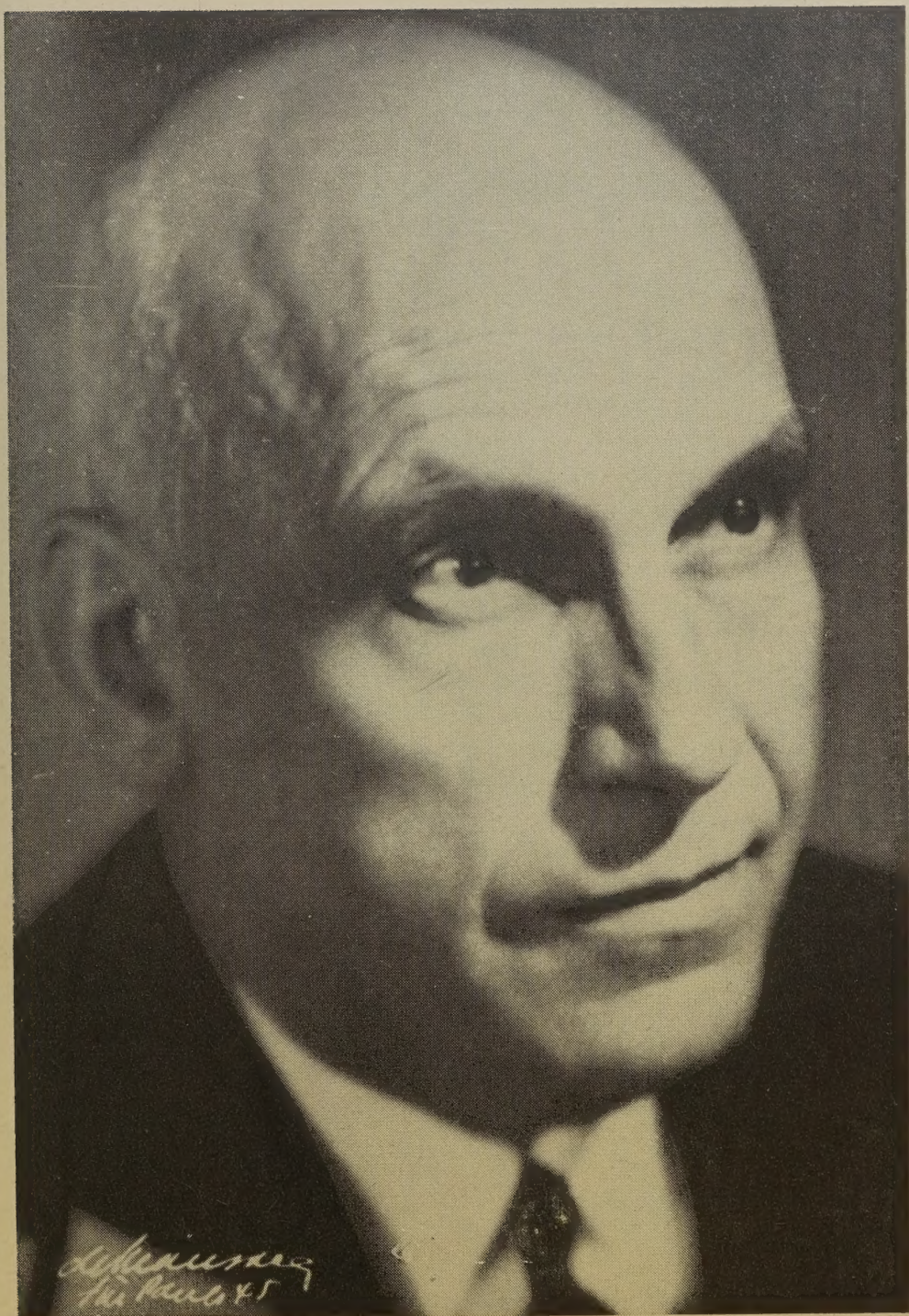
10. **Pigatti, A. e Giannotti, O.** — DETERMINAÇÃO BIOLÓGICA DO B.H.C. (ISÔMERO GAMA) EM SOLOS DE LAVOURAS DE CAFÉ, TRATADAS COM ESSE INSETICIDA E SUA CONFIRMAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL.
Biological assay of B.H.C. (GAMA ISOMER) in soils of coffee plantations treated with that insecticide and its confirmation by paper chromatography 101-107

11. **Autuori, M.** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA SAÚVA (*ATTA* spp. — HYMENOPTERA-FORMICIDAE) — VI. INFESTAÇÃO RESIDUAL DA SAÚVA.
Contribution to the knowledge of the sauva (ATTA SPP. HYMENOPTERA-FORMICIDAE) — VI. Residual infestation of the sauva 109-116

12. **Jenkins, A. E., Bitancourt, A. A. e Goidanich, G.** — ESTUDOS SOBRE AS MYRIANGIALES — IX. *ELSINOE* SOBRE CARVALHO — Estampas 16 e 17.
Studies in the Myriangiales — IX. Elsinoë on oak (Q U E R C U S S P P.) 117-123

13. **Silberschmidt, K.** — UMA DOENÇA DO TOMATEIRO EM PIEDADE, CAUSADA PELO VIRUS Y DA BATATINHA.
Estampas 18 a 21.
A tomato-disease from Piedade, caused by potato Virus Y 125-150

14. **Amaral, J. F., Teixeira, C. G. e Pinheiro, E.** — O BACTÉRIO CAUSADOR DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEEIRO.
The bacterial agent of the "mancha aureolada" of the coffee-plant 151-155



Professor Henrique da Rocha Lima
(1879 - 1956)

Professor Henrique da Rocha Lima
(1879-1956)

A 12 de abril de 1956, na cidade de São Paulo, faleceu o professor Henrique da Rocha Lima, antigo Diretor Geral do Instituto Biológico, cargo que exerceu desde 1933 até 1949, quando de sua aposentadoria por implemento de idade. Os assinalados serviços prestados por Henrique da Rocha Lima à Ciência e ao Instituto Biológico em particular foram assinalados no volume 11 dos "Arquivos", que constituiu edição comemorativa da passagem de seu sexagésimo aniversário. Nesse volume encontram-se dados biográficos completos do grande e saudoso cientista. Como homenagem do Instituto Biológico ao grande Diretor, que tanto contribuiu para que êle se destacasse em todo o mundo como organização científica, reproduzimos a seguir os discursos que em tôrno da vida e da personalidade de Rocha Lima proferiram discípulos e colaboradores do grande sábio.

PERSONALIDADE DE ROCHA LIMA

José Reis

Na primeira reunião de sexta-feira que se seguiu à morte de Carini, o professor Rocha Lima, dirigindo-se a êste leitoril, para o qual agora também me dirijo, fitou os olhos no auditório e disse: “Já chegou o Prof. Carini? Então podemos começar”. Queria com essa frase, que naquele momento assumia colorido patético, não apenas lembrar a assídua pontualidade do velho amigo do Biológico a estas reuniões, mas também salientar a importância que êle e Carini lhes atribuíam, como uma das atividades mais características da vida e do progresso do Instituto.

Meu primeiro impulso, agora que nos reunimos após a morte de Rocha Lima, bem poderia ser o de aproveitar a frase com que êle próprio marcou a presença do ausente Carini. Na verdade, porém, ela não teria sentido, pois o nosso antigo diretor e mestre, desde que pela primeira vez penetrou o Instituto Biológico, quando êste era ainda sonho ou larva, jamais dêle saiu, o que não tornaria possível assinalar-lhe a qualquer tempo o retôrno. Êle nunca esteve ausente dêste prédio, e muito menos dêste auditório, que ainda quando vazio palpita com sua personalidade dominadora. Quem não o reconhece a todo instante nestas paredes e nesta mesa, nestas cadeiras e naquele relógio, no teto e no quadro negro, e muito em particular neste ambiente de recolhimento e de templo, para não falar de todos os mínimos detalhes a que sua atenção e seu amor se aplicaram com o mesmo enlêvo e a mesma determinação com que se dedicaram aos grandes princípios?

Porque Rocha Lima era assim: homem dos grandes princípios tanto quanto dos pormenores aparentemente insignificantes. E por isso incorporou-se com tal intensidade a tôdas as realidades concretas e espirituais desta Casa, que impossível jamais será dissociá-las dêle. Volto a dizer: Êle está nos alicerces e nos muros tanto quanto na aparelhagem dos laboratórios; nos tijolos e nas pedras tanto quanto nos livros; na memória das ásperas lutas tanto quanto na alegre lembrança das colheitas. Transformou-se em tudo o que há de mais permanente em nosso Instituto. Mantém-se vivo e atuante em nós e entre nós.

O ensino superior foi uma das mais cruéis decepções de minha vida. Não encontrei, entre os homens que me deveriam ministrar a ciência com que ardentemente sonhava, nem sombra daquelas huma-

nas profundezas que conhecera, no ginásio, em Said Ali, em Laet, em João Ribeiro. Manguinhos compensou-me da desilusão, mas naquele tempo não oferecia, nem mesmo a um aluno laureado, a menor oportunidade de carreira. Foi nesse momento crítico que recebi o convite para vir trabalhar aqui, no Instituto que se fundava sob Neiva e Rocha Lima, dois espíritos extraordinários.

Rocha Lima! Esse nome exerceu sobre mim atração de ímã. Era o sábio que conquistara admiração e prestígio na douda Alemanha, aquêle cujo nome figurava entre os príncipes da história da microbiologia, como desbravador de caminho a quem não faltava, sequer, a beleza do martírio, pois também conhecera, na própria carne, a miséria da doença, cujo micróbio procurava descobrir. Aqui, sob sua orientação e a seu lado, encontrei o caminho de minha vida, a que êle jamais deixou de presidir, discreta e sábiamente.

Aprenderia mais tarde a descobrir, porque êle mesmo me revelaria, muita semelhança entre nossos temperamentos aparentemente tão diversos. E aprenderia, muito em particular, que o gênero de desalento que me trouxera até aqui nada tinha de vão. Era o mesmo profundo desencanto que o exilara em sua própria terra. Suas palavras, por isso mesmo, haveriam de ter, em mim, permanência invencível.

“Foi ontem, no silêncio de vosso jardim, que me encontrei a mim mesmo. E agora o ruído da cidade imensa se tornou mais distante e há em torno de meu coração um silêncio profundo em que vossas palavras se erguem como estátuas” (Rilke a Rodin) ⁽¹⁾.

Muito poderia eu contar dêsse mestre magnífico, de cuja intimidade intelectual pude privar como poucos neste Instituto, seja como assistente a quem competiam umas tantas tarefas de pesquisa e de aplicação, que êle indiretamente orientava, seja como colaborador na própria administração do Instituto, em suas lutas, em suas tarefas de esclarecimento e de defesa da obra que aqui se realizou. Não desejar a esta palestra, entretanto, o sentido de mera coletânea de recordações pessoais, pois a nostalgia de sua presença material, por ainda muito fresca em nós, não permitiria que alguém se pudesse desincumbir serenamente dêsse mister. Quero, por isso, reduzir minhas palavras aos termos de um depoimento que apenas focalize alguns aspectos mais típicos da personalidade de Rocha Lima como orientador, mestre e inspirador.

Penetrai o pensamento e a mais profunda maneira de ser daqueles que foram seus mais imediatos auxiliares e colaboradores, os que com êle partilharam as grandes lutas do Instituto, e encontrareis

em todos um certo número de íntimas convicções comuns, que nem sempre se exprimem por palavras, mas que repontam naturalmente como maneiras de ser que, por vêzes, se chocam violentamente com hábitos e preconceitos do meio. O desdém pelos títulos, o horror pelos programas e esquemas rígidos, o amor da exatidão sem o preconceito da desnecessária minúcia, a paciência de reabrir eternamente as mesmas questões, a intransigência para com a meia ciência e o elogio fácil, a tendência para o ecletismo, tudo isto são marcas que êle deixou de sua convivência e não como efeito de qualquer doutrinação sistemática. Teremos de voltar a estas coisas, a estas belas e tão incompreendidas qualidades. Antes, porém, deixai que eu recorde como plantava êle em seus colaboradores e discípulos êsses hábitos que afinal haveriam de marcar-lhe a escola.

Não era Rocha Lima dêsses mestres que, para impor-se, precisam assentar-se sôbre um estrado. Não necessitava de altear-se à custa de artifícios, porque se colocava naturalmente mais alto pela experiência que trazia e pela sutileza com que penetrava a alma de seus interlocutores. A autoridade emanava dêle, e não vinha de outrem, através dêle. Não pertencia, por isso mesmo, ao tipo daqueles homens palradores e agitados que procuram marcar sua importância com palavras, gestos e citações.

O segrêdo de sua perfeita identificação com o grupo que comandava consistia em estar sempre dentro dêsse grupo. Sem formalismos, estreitava contactos, informava-se junto de cada um, respeitando-lhe a personalidade, mas fazendo sentir, quando oportuno, seu conselho, sua crítica. Preferia a áspera simplicidade do grupo que com êle se identificava pelo trabalho, à intimidade fofa dos gabinetes e das antecâmaras políticas. Dirigia o Instituto de dentro, não junto dos potentados, aplicando-se a todos os pormenores de sua construção material, intelectual e moral, e participando de tôdas as suas aventuras e borrascas, sem nenhuma deserção, em momento algum.

Era, porém, nas reuniões do corpo técnico que êle mais ativamente procurava cimentar e elevar o grupo. Desde seus primeiros dias, a Divisão Animal, sob sua direção, e depois o Instituto todo, quando êle passou a Superintendente, conheceram o rigor de dois tipos de reuniões, ambas semanais. Umas, a que gostava de chamar de reuniões de "Referat", destinavam-se especialmente a congregar o corpo técnico para estudo comum, mediante relato e discussão de trabalhos lidos e resumidos da literatura científica. Outras, públicas, tinham por objetivo, mediante a apresentação de palestras sôbre

os mais variados temas, elevar a cultura geral e especializada. Assim se procurava evitar que o especialista, afundando-se cada vez mais no poço de sua especialização, acabasse perdendo de vista os horizontes mais amplos da ciência e da comunidade a que pertence. Êle próprio assim definiu, em circular, o objetivo:

“É importante acentuar que o caráter desejado para uma tal palestra visando instrução recíproca é de preferência o de uma aula ou preleção também compreensível para não especialistas do que de uma comunicação original para especialistas de uma sociedade científica. Assim deve ser nelas menor a preocupação de novidade e originalidade do que a de conhecimento aprofundado do assunto e sua interessante e instrutiva transmissão ao auditório.”

E acrescentava, grifado, para orientação dos conferencistas:

“As conferências devem, sempre que possível, ser feitas livremente, como verdadeiras e simples palestras ligando o orador ao auditório, que sempre o pode apartear e por fim estabelecer discussão, o que é muito desejável. Nelas procuramos sempre evitar a leitura de manuscritos, sobretudo os destinados a serem impressos, em que a seqüência, evitando as pequenas repetições e insistências tão necessárias na palestra, muito freqüentemente acarretam monotonia no falar e facilitam o desvio da atenção.

A experiência indica como necessária uma comunicação inicial ao auditório do título e das linhas gerais do assunto a ser tratado para melhor despertar interesse e fixar a atenção. Para isso é aconselhável escrever-se no quadro preto o título e principais pontos de reparo, o que também facilita ao orador a concatenação de sua exposição.

Em nossas reuniões é uso evitar os aplausos, as ênfases de discurso, os elogios convencionais ou recíprocos e as homenagens a vivos. Só em circunstâncias extraordinárias e com entendimento prévio aceita-se uma quebra dessa tradição das Palestras do Biológico, em que se procura tanto quanto humanamente possível manter a vaidade afastada da ciência e do espírito com que a cultivamos.”

Nessas reuniões exerceu Rocha Lima notável, embora a primeira vista imperceptível, ação educativa. Nas sessões de terça-feira, nos primeiros tempos, êle mesmo marcava, nas várias revistas, os artigos que deveriam ser referidos pelos assistentes. Seleção criteriosa, que ao mesmo tempo que respeitava as tendências individuais, procurava sàbiamente temperá-las com assuntos que obrigassem o leitor a sair um pouco de seu campo. Nas de sexta-feira era cuidadosa a escolha dos temas, que iam desde os assuntos de microbiologia, física e astronomia até problemas de arte e estética. Numas e noutras êle estava sempre atento, para corrigir discretamente os erros e as imperfeições. Dessa preocupação há prova, aliás, na circular a que antes me referi.

A regularidade de ambos os tipos de reuniões, a que êle jamais faltava e das quais nunca deixava de participar em igualdade de condições com todos os outros membros do Instituto, era tão grande que elas quase assumiam alturas de ritos religiosos. Eram, sem dúvida, a mais clara, freqüente e compreensível manifestação da vida coletiva do Instituto e representaram em São Paulo, durante muitos anos, oportunidade verdadeiramente rara de boa convivência e informação científica, o que explica o interêsse com que as procuravam os mestres estrangeiros que aqui viviam e nelas reconheciam o sadio e verdadeiro ambiente universitário a que se haviam acostumado em suas terras.

Deixemos, porém, as reuniões, em que toquei para ilustrar um dos aspectos da ação educativa de Rocha Lima, e tentemos lembrar alguns aspectos mais fortes de sua personalidade.

Ostentava profundo desprezo pelos títulos e diplomas acadêmicos. Não lhes negava o justo valor, é claro, mas vivia a clamar contra o estrabismo dos que confundem diploma com competência. Não estava muito longe de Valéry que afirmava serem a eleição e o diploma os maiores males de nossa sociedade ⁽¹³⁾. Num meio em que tão fàcilmente se confundem êsses dois conceitos e, por fôrça de interêsses estritamente profissionais, se procura valorizar mais o título que o conhecimento real, êle se erguia como incômodo profeta, que apedrejava alguns dos mais caros ídolos da terra. Não era, por isso mesmo, propenso aos questionários individuais, em que se esquadrinham os pormenores da vida de cada pessoa, reduzindo esta a uma série de fragmentos de informação, e não raro esquecendo o que ela tem de mais valioso, que é ela mesma por inteiro. Não era, decididamente, um homem de fichário. Projeção natural dessa maneira de entender e sentir era a reação, nêle violenta, contra os excessos das regulamentações profissionais, aplicadas à ciência, com o objetivo de tornar privativas desta ou daquela profissão as posições de pesquisa, como se fôsse possível retalhar o campo da ciência em territórios perfeitamente delimitados, e como se a atividade própria da ciência, por ser uma atividade de busca, não estivesse mais vêzes concentrada nos terrenos limítrofes do que nos já bem definidos. São inúmeras suas manifestações no sentido de fazer do Instituto Biológico um oásis onde pudessem encontrar-se representantes de tôdas as profissões, desde que animados pelo desejo de boa ciência e comprovadamente capazes para o trabalho da pesquisa. Sôbre a identidade de ideais e não sôbre as interesseiras alianças profissionais é que pro-

curava construir e manter a unidade do grupo, o seu “espírito de corpo”, de que êle tanto se orgulhava (6):

“As energias que nasceram e se avolumaram no interior desta nau abandonada às ondas alvoroçadas da instabilidade administrativa dos últimos três lustros receberam, como primeira e fundamental diretriz, a criação, silenciosa e inaparente, de um sadio ambiente interno com feições próprias, em que predominasse um vivo e forte espírito de dedicação ao ideal de aí formar para o Brasil um modesto embora, mas real fator de progresso e evolução ascendente, com energia e capacidade para estimular, congregar e coordenar valores humanos moral e cientificamente bastante fortes para fazer frente às forças contrárias do ambiente externo e da sua mentalidade dominada pelos hábitos, paixões e costumes locais da pequena política. Assim, poder-se-ia preparar, como preciosa sementeira, uma nova geração de guias realmente capazes de conduzir o país, ao menos no setor de nossas atividades, à linha de vanguarda que para êle almejamos.

Sabemos que não é com legislação, reformas e discursos, nem tampouco com largas remunerações, que se consegue formar e manter o desejado ambiente. O caminho é o da dedicação integral à idéia, em incessante alerta e pertinaz esforço, tentando infatigável e imperceptivelmente incutir a todo momento, em tôdas as situações, em todos os espíritos, os fundamentos de uma determinada ética profissional e uma norma de convívio capazes de manter uma atmosfera de respeito mútuo e honestidade de propósitos, em que o culto da verdade, do dever para com o país, da ambição de saber e de acertar, da satisfação em colaborar, assim como da capacidade de estudar, ensinar, aprender, experimentar e, especialmente, de criticar os próprios conhecimentos e as próprias atividades, não sejam apenas aparências e ficções mas sim comprovadas e cultivadas realidades. Mais do que na esfera intelectual carece a nossa formação científica de esteios construídos e defendidos no domínio da ética. Domínio êsse para o qual em amplos setores do ambiente externo só se encontra desinterêsse ou escárneo.

Realizamos, até agora com bastante sucesso, longa e vasta experiência por êsse espinhoso e incerto caminho diametralmente oposto ao da clássica, cômoda e muito utilizada fórmula política do “divide et impera” que, à custa do bem público, permite tranqüila e superior inoperância ou garante os aplausos do lado apoiado dos que se degladiam depreciando-se recíprocamente, enquanto se abre caminho aos ousados e astutos tecnocratas amigos, para a satisfação de suas ambições pessoais.

Ousamos enfrentar a árdua tarefa da formação e conservação dêsse ambiente interno sereno, alegre e são, imunizado, tanto quanto possível contra o fermento paralisante e desagregante das rivalidades estéreis, das despropositadas suscetibilidades e injustificáveis hipertrofias a serviço da ambição ou da vaidade e das discórdias e inimizades transformadas em disputas de prestígio, não só entre indivíduos mas sobretudo entre agrupamentos por êstes chefiados. Essas paixões e preocupações, desviando a atenção e o brio para outro campo fora da cogitação da ciência atiram para um segundo plano, quando não

desvirtuam, falseiam ou desdouram por completo, as realizações e as atividades de qualquer instituição científica, por mais polida e resplandesciente que seja a sua fachada.

Assim foi que se conseguiu formar e se cultiva o invulgar, bastante invejado e sempre florescente conforto moral característico do nosso ambiente íntimo, nos moldes do qual os espíritos aí formados crescem continuamente em valor e renome, sem temer a sombra do crescimento paralelo ao seu lado do valor e do renome de seus companheiros, e muito menos ainda conhecem os complexos de inferioridade, geradores de inquietação pelos sucessos de qualquer outra instituição congênere.

Esse espírito documenta-se amplamente no desejo e na solicitude com que sempre se prontificam a cooperar e na vivacidade de sua colaboração, não só entre si mas do mesmo modo com os departamentos federais e estaduais, quando sèriamente empenhados em qualquer realização útil. Esse ambiente interno é o dos criadores, responsáveis e mantenedores da fonte de energia e do renome do Instituto e de seus assistentes possuídos do mesmo espírito. Isso não exclui a existência de representantes da mentalidade do ambiente externo, nem a possibilidade de que parasitas atinjam e se apeguem à árvore frondosa que os abriga para sugar-lhe a seiva, permanecendo-lhes, esta, estranha e incompreensível. São, porém, praticamente inexistentes. Aquilo de que nos orgulhamos atua neste caso como um repelente. O seu afastamento, mais ou menos espontâneo, tem permitido como que uma concentração de energias reais, por evaporação dos valores fictícios e dos inadaptáveis."

Apoiado nesses pontos de vista conseguiu fazer do Instituto Biológico uma congregação unida e aberta, constituída de especialistas das mais diversas formações, insistindo sempre em mantê-la assim, porque só dêsse modo poderia manter em nosso meio a desejada fecundação cruzada de idéias e técnicas. Consequência dessa atitude era, naturalmente, a resistência que opunha à tendência, tão comum entre nós, para substituir pelo formalismo dos concursos de provas a exata e precisa ponderação dos valores científicos. Não combatia o concurso em si, como idéia de seleção, de escolha do melhor dentre muitos. O que impiedosamente criticava era o apêgo às más fórmulas de concurso, que servem a limitados objetivos de seleção, e que não raro afastam, por sua própria regulamentação, a possibilidade de concurso dos mais capazes, limitando-se a esperar pelos interessados, em vez de os buscar diligentemente, onde quer que se encontrem. O que repelia era a idéia simplista de que sòmente por meio de exames seja possível aquilatar do valor dos sábios. A sinceridade com que defendia êsses pontos de vista e os critérios de seleção que procurava aplicar, levou-o a sérias divergências com algumas de nossas mais festejadas e influentes personalidades, quando estas,

para marcar o direito de seus representados a uma posição mais alta, nas escalas de vencimento ou de hierarquia, do que a dos pesquisadores do Instituto, apelavam para o argumento do concurso. Numa dessas ocasiões, a quem lhe falava em “porta larga do concurso” retrucou com a “porta estreita do mérito”.

O que acabo de lembrar ilustra a determinação com que Rocha Lima sabia lutar, até a impertinência, pelo seu grupo, e prestigiá-lo. Orgulhava-se dêle, amava-o. Contava como suas as vitórias de cada um de seus membros. Essa relação não cessou com a aposentadoria; esteve presente, nele, até a morte ⁽¹⁰⁾.

Duas frases de Rocha Lima logo se impunham a quem com êle privava, nas reuniões científicas ou em simples relações de funcionário e chefe. Frases que ficam como estátuas, como aquelas estátuas rilkeanas a que já aludi. Eram elas: “não tem nada de definitivo” e “metade de um jeito, metade de outro”. Expressiam não só sua constante preocupação em não adotar fórmulas definitivas, mas também a sabedoria das decisões ecléticas. Por mais estudados e debatidos que fôssem os assuntos, e mais laboriosamente conseguidas as soluções, jámais se impacientava êle com a possibilidade de reabrir a discussão, para considerar novos argumentos. Êsse retôrno, ainda quando para repisar argumentos vencidos, nunca o irritava. Fazia parte de sua natureza aceitar a objeção e justificar-se. Mas não era fácil de dobrar ou vencer, e a diluir com o grupo sua responsabilidade por uma medida que reputasse má, preferia assumí-la tôda, contra o grupo, mas depois de bem esclarecido êste. Com essa boa e amiga filosofia do “nada de definitivo”, que representa aliás a transposição do próprio conceito da ciência para a prática da administração, manteve êle o justo equilíbrio entre a ciência pura e a aplicada e, sem negar a necessidade e a conveniência dos horários, jamais os desejou rígidos. E como é hábito de nossos govêrnos, periòdicamente, investir contra êsse problema, procurando os burocratas que ditam normas tudo reduzir a esquemas muito sumários, conciliava Rocha Lima os ímpetos da administração com os interêsses da vida de laboratório provocando reuniões periòdicas para tratar dos horários. Reuniões que sempre chegavam a uma fórmula aparentemente rígida, mas que “não tinha nada de definitivo”. Assim saciava a sêde de ordem burocrática dos governantes, sem prejudicar a sêde de justa liberdade daqueles a quem dirigia, e que não raro, pelo menos nos primeiros tempos, viam a madrugada através das janelas de seus laboratórios.

Falei de ecletismo. Há o bom e o mau. Êste último é o dos que fazem de sua opinião uma simples colcha de retalhos de alheios pensares. Aquêlé é o dos que sabem que ninguém possui a verdade inteira e que para nos aproximarmos desta é preciso submeter cada opinião, cada filosofia, a uma análise meticulosa e desapaixonada, que nos permita reconhecer que a opinião que afinal adotamos não é nunca integralmente de ninguém. Êste é o ecletismo dos que não sentem a necessidade de matricular-se prèviamente em nenhuma escola de pensamento, para adquirir o direito de pensar. É o ecletismo dos que não aceitam sistemas rígidos nem desejam viver à sombra exclusiva de um nome. Não poucas vêzes ridicularizou Rocha Lima a estreiteza dos que pensam em têrmos de escola. As escolas não representam tanto a maneira de pensar, as convicções científicas básicas, quanto a maneira de ser e reagir, as virtudes fundamentais de seu chefe. Assim, duas escolas muito diferentes podem defender a mesma doutrina científica, ao passo que na mesma escola o discípulo pode derrotar o mestre sem precisar por isso renegá-lo. Êste era o ecletismo de Rocha Lima, expresso em sua frase que, de tão repetida em ocasiões tão diversas, se tornou quase um traço de sua personalidade como chefe: “metade de um modo, metade de outro”.

Desde os primeiros contactos com o mestre surgia, a respeito da mais simples experiência, a questão dos contrôles. E era natural que assim fôsse, tratando-se de pesquisador dos mais rigorosos que a microbiologia conheceu. Essa paixão, sim, define uma escola, especialmente quando aliada ao horror do perfeccionismo, que nada constrói e que consiste no excesso de apuração dos meios de trabalho, em desproporção com a natureza e a precisão de resultados buscados. É a escola oposta à tórre de marfim, a escola dos que compreendem que a ciência não pode divorciar-se do meio em que se desenvolve e que, para poder agir eficazmente sôbre êle, não basta que os cientistas saibam os fins que têm em mira e o potencial de utilidade que se concentra na mais pura das experiências, mas é preciso também que o público sinceramente compreenda êsse trabalho. Tudo isto explica haja Rocha Lima, como também Artur Neiva, posto grande empenho nas tarefas de divulgação das atividades do Instituto Biológico, divulgação dirigida a todos os círculos da sociedade. Patrocinou, estimulou e diretamente cooperou na publicação, ao lado dos “Arquivos”, que são repositório de trabalhos originais, de uma revista dedicada aos agricultores, “O Biológico”, e deu todo apôio à publicação de folhetos destinados a mobilizar o conhecimento e a experiência dos especialistas em benefício imediato da sociedade.

Era, ainda, um homem permanentemente ocupado em planejar gráficos, desenhos e escritos de toda espécie que dissessem, de maneira clara, berrante mesmo, do trabalho do seu Instituto. Não se confundia, porém, essa atividade com a da propaganda mentirosa, destinada apenas a embair e impor “slogans” que fiquem no ouvido. O que ele se ocupava em fazer — e muito hábilmente fazia — era precisamente o inverso disso: era justificar, de maneira clara e não raro pitoresca, as verdades que apregoava. Perfeito modelo dessa atividade é o artigo “Mais um ano” ⁽¹¹⁾, que ele preparou. Outro exemplo, em gênero diverso, é um belo “folder” de 4 páginas, que nos mostra, em seqüência, a fotografia do Instituto, suas características, os resultados práticos da ciência nele cultivada e os vários tipos de ação do Instituto. Em cada um dos escritos que compõem esse folheto nota-se, pelo estilo muito próprio, o trabalho exclusivo de sua inteligência: ele redigiu, ele escolheu a côr e a resistência do papel, o tamanho do folheto, ele pensou em tudo. A título de ilustração convém transcrever a página relativa às características do Instituto:

“Conforme a mentalidade que delas se apercebe, são elas causa para uns de incompreensão, desintêresse e mesmo aversão, e para outros de especial aprêço, estima e até de orgulho nacional.

É um Instituto de ciência aplicada, que tanto difere das instituições técnicas em que doutores não estudam, como das científicas em que os estudos ficam alheios à prática,

onde são cultivadas em igualdade de esforço as ciências básicas e sua aplicação prática em constante apóio recíproco,

onde pois se forjam na pesquisa e na experimentação as armas de suas realizações práticas e se colocam em quarentena os palpites de autoridades convencionais e da erudição livresca,

onde se formam os técnicos especializados e cientistas de que o Brasil precisa para a defesa de sua agricultura,

onde se verificam e se retomam constantemente os problemas práticos em busca de aperfeiçoamento em vez de defender comodamente técnicas estabilizadas,

onde não se briga, não há grupos a se degladiarem, não medram rivalidades pessoais mas trabalha-se intensamente somando esforços em boa camaradagem,

onde o espírito de realização e de colaboração, o culto à verdade e à superposição dos interesses públicos aos individuais são os traços dominantes de sua orientação,

onde se exigem realizações de alto nível internacional em vez de aceitar e procurar justificativas para qualquer inferioridade nacional.”

Muitos dos visitantes ilustres que passaram por esta casa, viram uma série de caricaturas, planejadas pelo Prof. Rocha Lima, para mostrar as dificuldades opostas ao desenvolvimento do Instituto; país do futebol, uma delas apresentava cena de um jogo em que os desportistas eram agarrados, derrubados, peados pelos menos honestos, incapazes do "fair play". Não nos podemos, todavia, demorar nos pormenores. Mas também não podíamos omitir este, que reflete um dos sentidos mais típicos que êle imprimiu ao Instituto Biológico: o sentido da comunicação, da informação e da documentação, que difficilmente se encontrará tão desenvolvido noutra instituição. Pelo zelo com que procurava transformar em boa informação a experiência aqui adquirida, impedindo que o conhecimento morresse com o prazer do cientista em obtê-lo, bem se poderia atribuir a êle o conceito de Baker ⁽¹²⁾ recentemente expresso na revista "Nature", segundo o qual a difusão do conhecimento adquirido na pesquisa científica faz parte integrante do próprio trabalho da pesquisa.

Não é preciso lembrar o horror de Rocha Lima à falsa e à meia ciência. Encarregou-se de desmascará-las em sua preciosa conferência "Vicissitudes da Vida Científica" ⁽⁷⁾ e em vários dos escritos citados no correr desta palestra. A elas sempre se opôs desasombradamente, ainda que com temporário sacrifício, às vezes, de vantagens materiais para seu Instituto.

A vida de Rocha Lima à testa do Instituto Biológico foi uma áspera luta, cujos aspectos principais êle próprio foi relatando em periódicos artigos, corajosamente atirados ao próprio rosto das autoridades responsáveis pelos descabros que denunciava. Em "Ambientes e Atividades" ⁽⁶⁾, "Peias e Realizações" ⁽²⁾, "Marco miliário" ⁽⁴⁾, "Solene retrospecto" ⁽⁵⁾, "Marcha na Areia" ⁽³⁾ acham-se escritas duríssimas verdades sobre a administração nacional e o caráter de nossos homens públicos. Verdades realmente tão duras que uma vez não puderam ser impressas por determinação superior, mas que apareceram logo depois de cessada a coação. Num desses escritos denuncia o lento trabalho de desorganização do Instituto pelo "quase desaparecimento ou a existência apenas fictícia da possibilidade de seleção", aponta os excessos do formalismo administrativo que impõem a dolorosa contingência de agir irregularmente para defender o interesse público ⁽⁶⁾, e lamenta ser forçado a entrar em conflito com a incompreensão, a insinceridade e a irrerealidade desse ambiente, cuja semelhança com a velha Espanha de Ramon y Cajal melancolicamente assinalava ⁽⁶⁾.

Noutro revolta-se, vibrante, contra o cerceamento da liberdade de pesquisa e a prepotência das leis uniformizadoras, que entendem democrático o nivelamento pelos padrões da mediocridade ⁽³⁾.

Em muitas ocasiões denuncia a “crença no diploma”, que leva os governantes a aceitar que o simples título profissional seja prova bastante de competência científica, assunto que mais amplamente desenvolveu no artigo “Com Oswaldo Cruz em Manguinhos” ^(8 b).

Com especial vigor ataca as tentativas de mutilação do Instituto Biológico, inspiradas de um lado na incompreensão da ciência e na ingênua fé nos singelos, rígidos e simétricos esquemas feitos no papel, em nome de falsos princípios de organização que desconhecem a objetiva realidade das coisas e sua história, assim como êsse fato importante e básico de que a instituição científica não é nem a estrutura nem os homens que a compõem, tomados isoladamente, mas um organismo vivo, um indivíduo, no exato sentido daquilo que não pode ser dividido sem deixar de ser o que é ⁽¹¹⁾.

“Por mais dolorosos, desalentadores e não raro humilhantes que tenham sido os sofrimentos daqueles que há tantos anos vêm abnegadamente concentrando todos os seus esforços na formação da mentalidade científica que caracteriza o Instituto Biológico de S. Paulo, é indispensável que com os olhos fixos nos interesses superiores de nossa nacionalidade, recalquemos todos os sentimentos ainda os mais justos e naturais, capazes de fazer esmorecer o ânimo para continuação da luta, e confiemos na força moral de nossas realizações para a defesa do patrimônio conquistado e na energia de nossa atividade para o avanço na realização dos ideais patrióticos por que nos batemos.

O simples fato de subsistir ainda o Instituto Biológico com as mesmas finalidades, suas mesmas incumbências e sobretudo com o mesmo espírito científico que cultivou no meio de todos os múltiplos e variados fatores de destruição que a todo o momento se têm levantado em seu caminho, já deve constituir motivo de vivo júbilo e de confiança na nossa gente. Mais perigosa para os interesses nacionais do que mesmo a sua destruição ou mutilação, tantas vezes tentada e anunciada, teria sido qualquer transformação de seu campo de ação, pois insano seria então o desânimo e a transfiguração moral e científica desse espírito há dez anos intensamente cultivado.”

Como não foram poucas essas tentativas de mutilação, é fácil imaginar a luta sem quartel que teve de desenvolver para impedir que o capricho dos maus políticos viesse a quebrar aquilo que era fundamentalmente uno, luta essa que às vezes assumiu extrema dramaticidade, pois é certo que algumas tentativas de esfacelamento não eram apenas alimentadas pela incompreensão ou ingenuidade, que podem ser vencidas pelo esclarecimento, mas pelo propósito mesmo de destruir o Instituto e assim dispersar a impressionante mas-

sa de bom trabalho científico que nele se construía, a contrastar com tantas esterilidades pomposamente criadas e a demonstrar o acêrto da orientação que o presidia, em flagrante oposição a fortes tendências e preconceitos do meio.

Houve, nessas refregas, instantes verdadeiramente dramáticos, em que Rocha Lima jogou seu cargo com a decisão heróica dos generais que reconhecem chegado o momento do supremo sacrifício de perecer, para não ceder. A minuciosa narrativa dessas lutas haverá de ser feita noutra oportunidade. Qualquer que fôsse, porém, a onda de animadversão que contra êle crescesse, o certo é que aos poderosos nunca pediu o que era de sua obrigação dar ao Instituto, mas reclamou-o, exigiu-o, arrazoando sempre com precisão. Não era homem para obter como favor, e a trôco de concessões, que lesassem os altos ideais da ciência, aquilo que a esta devia ser dado como homenagem ou reconhecimento de seu valor.

Estas recordações trazem à tona uma das virtudes capitais de Rocha Lima: a de dizer a verdade, a verdade nua e crua, numa terra de meias palavras, de complacências e de cômodas irresponsabilidades. “Os caçadores de verdades, que são os legítimos homens de ciência” — dizia — “a elas não raro sacrificam tôdas as vantagens e conveniências das boas falas e das belas aparências, pelas quais hábeis diplomatas julgariam talvez mais acertado o sacrifício de tôdas as verdades” (5).

Associada à aversão pelo elogio fácil e pela tendência para endeusar a pseudo-ciência, tão comuns em nosso meio, essa coragem de dizer verdades não lhe poderia custar outra coisa senão aquela posição de quase exilado em que permaneceu em nossa Pátria. Não poucos ouvidos se fizeram moucos à sua voz, muitos olhos cegos à sua presença. Chegaram mesmo a tentar diminuir-lhe a estatura científica, inventando outros autores para suas descobertas, autores êsses descobertos — é de pasmar — nas próprias obras de Rocha Lima, que jamais os esconderam.

A aspereza da luta e a repugnância pelos motivos que levantaram contra o Biológico o ânimo destruidor de tantos maus patriotas não conseguia, entretanto, turvar a serenidade com que Rocha Lima presidia ao seu Instituto e participava de todos os seus atos. Em meio a algumas das mais sérias campanhas de destruição do Instituto foi que aqui se realizaram, com sua presença e ativa participação, algumas das mais alegres de nossas reuniões sociais, como a que se deu por ocasião de seu 60º aniversário. O homem torturado pelas injustiças, martirizado pelo asco que nele provocavam os motivos

da falsa ciência, insultado pelo desrespeito de alguns potentados indignos das funções que exerciam, nada externava daqueles martírios quando lia o seu “Biologíadas”, pitoresco poema em que, entre outras muitas coisas, alegremente ferreteava uma das manias da época, as circulares administrativas ⁽⁹⁾:

“Dos artigos à venda o mais notório,
Cujo estoque jamais vai acabar,
É papel, papelinho e papelório,
Cuja forma querida é a circular.”

Muito mais gostaria eu de recordar: o carinho com que se aplicou Rocha Lima à organização de Mato Dentro, a fazenda experimental do Instituto; seu temperamento profundamente estético, ao qual não passava sem branda crítica tôda arrumação de menos gosto feita em qualquer dos laboratórios; a paradoxal timidez, que o levava a torturar-se em escritos, em que fixava e refixava pontos de vista; o humorismo com que por vêzes desarmava a impulsividade do interlocutor. Mas não há tempo para tudo isso, tanto mais quanto aguardamos a palavra de outros companheiros, que deverão aprofundar outros aspectos da excelsa personalidade de nosso Mestre.

Seja-me apenas permitido mais uma vez relembrar, porque foi o primeiro de seus traços que me impressionou, o alto espírito de tolerância de Rocha Lima, que jamais impediu que qualquer de seus discípulos, colaboradores ou simples subordinados, lhe dissesse, crua e francamente, o que bem entendesse. Aceitava paciente a crítica a todos os seus atos, sempre disposto a explicá-los e revê-los. Só não perdoava a falta de respeito e de compostura, e isto mesmo, acredito, não pelo que de ofensa pudessem conter, mas pelo atentado à ética e, mais ainda, à estética, que tais atitudes encerram.

Êste o homem que se foi, sem todavia ausentar-se, de tal modo se entranhou nas coisas do Instituto, e em nós. Assim foi o Capitão dêste barco. Assim construiu esta Casa e nela viveu, amando e servindo a Ciência e a Humanidade, Henrique da Rocha Lima.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Carta de 11 de setembro de 1902, coleção do Museu Rodin, in Pierre Desgraupes — Rainer Maria Rilke, Pierre Seghers Ed., 1949.
- (2) Peias e Realizações. *O Biológico*, 4, 1, 1 (1940).
- (3) Marcha na Areia. *O Biológico*, 9, 1, 1 (1943).
- (4) Marco Miliário. *O Biológico*, 10, 1, 1 (1944).

- (5) Solene Retrospecto. *O Biológico*, 12, 1, 1 (1946).
- (6) Ambientes e Atividades. *O Biológico*, 13, 1, 1 (1947).
- (7) Vicissitudes da Vida Científica. Ed. da S. B. P. C., 1949.
- (8) Com Oswaldo Cruz em Manguinhos: a) *Anhembi*, 6 (16):26, 1952; b) edição ampliada em *Ciência e Cultura*, 4:5 (1952).
- (9) Esse poema faz parte do volume "Archiv fuer wissenschaftliche und praktische Makanenkunde", editado em 1941 pelo corpo técnico do Instituto Biológico como caricatura do volume jubilar que no mesmo ano foi publicado pelos *Arquivos do Instituto Biológico*.
- (10) *Anhembi*, maio de 1956.
- (11) Mais um ano, *O Biológico*, 5, 1 (1939).
- (12) J. R. Baker — *Nature*, 5 de novembro de 1955.
- (13) P. Valéry — cit. em Maurois, "Un Art de Vivre".

OBRA CIENTÍFICA DE ROCHA LIMA

Otto Bier

FEBRE AMARELA — A anatomia patológica da febre amarela constituiu, sem dúvida, tema predileto de Rocha Lima, desde o início de sua carreira científica, em 1903, ao lado de Oswaldo Cruz em Manguinhos.

Predominava, então, a idéia arraigada e brilhantemente defendida entre nós por Azevedo Sodré e Miguel Couto (¹), de que a febre amarela era essencialmente uma poliesteatose aguda, cujo diagnóstico post-mortem podia ser feito macroscopicamente, pela simples verificação de icterícia, hemorragias e da côr mais ou menos amarelada do fígado, resultante de um processo de degeneração gordurosa. Mesmo a missão francesa que nos visitou em 1903, integrada por Marchoux, Salimbeni e Simond, em seus substanciosos e bem ilustrados relatórios publicados nos Anais do Instituto Pasteur, em 1903 e em 1906 (2,3), focaliza quase que exclusivamente a atenção sobre a esteatose generalizada, isto é, sobre a já bem conhecida ocorrência de gotículas de gordura em diversos órgãos. Cabe a Rocha Lima a primazia de haver contrariado a afirmação axiomática de que a degeneração gordurosa representava a lesão fundamental da febre amarela. De seus trabalhos, realizados em Manguinhos em 1905 e em 1906, chega à conclusão de que mais importantes que as lesões de esteatose assinaladas com tanta ênfase pelos autores que o precederam são as lesões necróticas, observadas sobretudo no fígado e no rim. Estas observações, feitas nas quatro últimas dezenas de casos com que terminou a gloriosa campanha profilática de Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, foram continuadas e ampliadas na Alemanha, onde só foram publicadas seis anos mais tarde (4,5), após cuidadoso estudo comparativo do material de febre amarela com o de numerosas outras moléstias infecciosas, como a peste, a malária, a varíola, o typhus, a febre recorrente, septicemias, histoplasmose, etc.

O quadro histopatológico característico da febre amarela é, então, descrito como o de uma necrose predominante, com esteatose salpicada, da zona intermédia do lóbulo hepático. A estrutura trabecular do fígado se mantém intacta, apesar da necrose extensa, e o que é, por assim dizer, patognomônico é o fato de não coincidir, em regra, o depósito de gordura com a necrose nas células hepáticas. Assim, pois, tudo leva-o a crer que a esteatose e a necrose sejam dois

processos independentes causados pelo ataque do vírus amarelógeno: um, que leva a célula a uma forte perturbação do metabolismo das gorduras, que nela se depositam (depósito de gordura e não degeneração gordurosa); outro, que conduz à morte da célula, sem que se observem vestígios morfológicos daquela perturbação metabólica. No primeiro caso, isto é, nas células com esteatose, mais abundantes em torno da veia central e na periferia do lóbulo, o citoplasma é anfófilo e o núcleo se apresenta bem conservado; no segundo caso, o citoplasma é fortemente eosinófilo, com pouca gordura, e os núcleos estão profundamente lesados ou destruídos. A necrose não pode, pois, ser considerada como um estágio mais avançado da esteatose, mas sim como lesão independente, embora ambos os processos resultem provavelmente de uma causa comum, porém com graus variáveis de intensidade ou de receptividade.

A regeneração do tecido hepático se faz à custa da multiplicação das células que escapam à necrose e que, mesmo quando sobrecarregadas de gordura, mostram freqüentemente figuras de cariocinese em seus núcleos.

As observações histopatológicas de Rocha Lima levam-nos ainda à interpretação da patogênese da icterícia na febre amarela, pois consegue evidenciar com toda a nitidez que os capilares biliares, transportadores da bile formada pelas células hepáticas bem conservadas (com ou sem esteatose), interrompem o seu trajeto ao atingir os espaços deixados pelas células necrosadas, onde devem derramar o seu conteúdo. Infiltrando-se entre as células necrosadas ou seus fragmentos, a bile atinge os espaços linfáticos e, a seguir, a circulação sanguínea. Rocha Lima propõe, então, que se designe a icterícia amarelógena, explicável pela avaria de elementos isolados da parede dos capilares biliares pela expressão icterícia *per dieresin*, distinta da icterícia de estase descrita por Eppinger, resultante da distensão e ruptura dos capilares (icterícia *per rhexin*) e de outras formas sem base anatômica verificável, em que se supõe desvio da secreção (icterícia *per diabsin*).

Além das lesões do fígado, chama Rocha Lima particularmente a atenção para as alterações renais, que muito se assemelham às da nefrose produzida pelo sublimado, na qual, além das lesões degenerativas do epitélio tubular, encontram-se, não raro, na luz dos tubos, concreções calcáreas.

As pesquisas histopatológicas de Rocha Lima resultaram em profunda modificação do conceito anatomo-clínico da febre amarela, substituindo o velho conceito de uma simples poliesteatose pelo de

uma nefrohepatose com esteatose generalizada, esta última decorrente de perturbação metabólica, mas não indicadora de degeneração celular: "Alles spricht eher dafür, dass bei Gelfieber neben und unabhängig von einer starken allgemeinen Störung des Fettstoffwechsels, eine Anzahl von Parenchymzellen besonders der Leber und der Nieren der Nekrose anheimfallen" ⁽⁵⁾. Este conceito, tão claramente enunciado em 1912, deveria ser firmado definitivamente em 1928 pelo notável trabalho clínico de Sinval Lins ⁽⁶⁾, por ocasião do pequeno surto epidêmico de febre amarela que ocorreu no Rio de Janeiro.

Da mesma maneira, a enorme importância dos achados no diagnóstico post-mortem da febre amarela de Rocha Lima deveu também esperar cerca de vinte e cinco anos pela sua consagração. A introdução sistemática do exame histopatológico do fígado no programa de estudos epidemiológicos sobre a febre amarela empreendido pela Comissão Rockefeller no Brasil, sob orientação de F. L. Soper, veio consagrar o valor prático dos achados de Rocha Lima. O exame de milhares de amostras de fígado por meio do viscerótomo, um instrumento simplíssimo inventado por Décio Parreiras e aperfeiçoado pelos autores americanos ⁽⁷⁾, "a confirmé l'opinion (Rocha Lima, 1912) selon laquelle les lésions multiples produites par la fièvre jaune sont dans les coupes microscopiques du foie, différentes dans la plupart des cas de celles que provoque toute autre affection fébrile aigüe et rapidement mortelle" ⁽⁸⁾.

O resultado de tais exames veio evidenciar a importância dos casos de infecção inaparente na manutenção dos focos endêmicos de febre amarela, possibilidade, aliás, para a qual Rocha Lima, desde 1914, havia chamado a atenção: "Experimentelle Beweise liegen zwar nicht vor, aber klinisch sehr leicht verlaufende Fälle lassen die Vermutung zu, das es auch eine symptomlose Infektion geben kann" ⁽⁹⁾.

Citamos estes fatos para ilustrar o enorme alcance dos trabalhos de Rocha Lima em relação à patogenia e à epidemiologia da febre amarela. Entretanto, ao apresentar as suas comunicações de importância básica, em 1911 e em 1912, foram elas recebidas com a maior indiferença e ceticismo.

É interessante reproduzir as discussões que se seguiram à apresentação de seu trabalho à Sociedade de Patologistas Alemães, em Estrasburgo, em 1912 ⁽⁵⁾:

"v. Gierke: Há poucos dias enviaram-me o fígado de um soldado, que morrera dentro de três dias em consequência de uma in-

toxicação grave. O fígado estava um pouco diminuído de volume e mostrava, ao corte, nítido desenho dos acinos, com centro vermelho e periferia amarela. Microscòpicamente lembrava o aspecto das alterações descritas pelo Sr. da Rocha, sòmente em meu caso havia apenas duas zonas, uma interior necrótica e uma exterior, maciçamente gordurosa. Apesar do quadro observado desviar-se do quadro usual da atrofia amarela aguda, considere-o como tal e pergunto se outros casos semelhantes não ocorrerão aqui na Alemanha.

Prym: Posso preparados de um fígado com a característica necrose intermediária, absolutamente semelhantes aos que o conferencista demonstrou. O fígado provinha, se não me falha a memória, de um caso grave de apendicite gangrenosa. Depois disso, procurei idênticas lesões em casos de doenças intestinais agudas graves e de peritonite, porém não as encontrei. As alterações foram por mim consideradas como de atrofia amarela aguda em início. Os achados no fígado não são por si só patognomônicos da febre amarela.

Fischer: Não raro encontram-se necroses semelhantes às que o conferencista demonstrou, localizadas na zona média dos acinos, em casos de peritonite séptica e de apendicite.

Rocha Lima: Não afirmei que a necrose intermediária do lóbulo hepático fôsse patognomônica da febre amarela. Opie já teve ocasião de sôbre êste assunto referir pormenorizadamente e eu tive também ocasião de encontrar a necrose intermediária em outras doenças. Quis salientar principalmente a constância das alterações e, particularmente, de certos pormenores histológicos relacionados ao ataque pelo virus amarílico e que não encontrei em outras doenças. Sôbre êstes pontos não se manifestaram os oradores que discutiram o meu trabalho. A necrose central, que sabidamente ocorre em muitas doenças infecciosas, não foi por mim observada na febre amarela."

Como se vê, a reação de Rocha Lima foi firme e categórica, mas tinha em seu desfavor pelo menos três fatores ponderáveis: era um sul-americano jovem (contava, então, apenas trinta e dois anos), presumivelmente ainda pouco experiente e que procurava derrubar um dogma, ao criar uma síndrome anatomo-patológica característica de uma doença já tão bem estudada como a febre amarela!

É profunda a decepção de Rocha Lima em face da reação dos que considerava como mestres e dos quais esperava maior compreensão. Em um de seus escritos íntimos, encontro o seguinte passo: "Em que se observa como mesmo os maiores mestres, incomparável-

mente mais ricos em saber e experiência, podem decepcionar quem a eles recorre, quando o assunto novo ultrapassa os limites do campo de suas habituais atividades". Não desanima, porém: "aprende a necessidade de, mesmo sentindo-se pequeno e fraco, não desanimar diante do gigantesco obstáculo dos conceitos estabelecidos e geralmente aceitos e repetidos unânimemente pelas maiores autoridades, quando se observa clara e serenamente um fato em pleno desacordo com êsse dogma".

Nos anos subseqüentes, continua, em meio a outras preocupações, a investigar a especificidade do quadro que descreveu. Envia um pedido circular aos anatomopatologistas alemães para que o auxiliem no esclarecimento do problema, fornecendo-lhe material de casos com lesões por eles consideradas semelhantes às da febre amarela. Recebe, assim, numerosos pedaços de fígado com lesões necróticas da zona intermediária, provenientes de casos complicados de supuração abdominal subseqüente, na maioria das vezes, a apendicites. Convence-se, mais uma vez, de que as lesões observadas em tais casos diferem radicalmente da lesão amarílica, porém insiste na necessidade de se emprestar ao exame histopatológico do fígado o devido rigor científico, a fim de evitar os diagnósticos baseados em preparados obtidos com técnica inadequada e interpretados por quem não possua prática suficiente de tais exames ⁽¹⁰⁾.

Depois de lutar contra a descrença, teve Rocha Lima também que lutar pela prioridade de sua descoberta e o fez com a compreensível agressividade de quem defende um direito líquido, após haver esperado vinte longos anos pelo seu reconhecimento. Dois foram os pontos de ataque à sua obra. Em Manguinhos, Penna & Figueiredo (11, 13) chamam a atenção para o fato de haver, muito antes de Rocha Lima, o patologista americano Councilman descrito as lesões necróticas do fígado e do rim e dão relevo especial à verificação de células necrosadas, hialinas e fortemente eosinófilas, às quais dão o nome de células de Souncilman. Estas, sim, seriam patognomônicas da febre amarela e não o "sinal de Rocha Lima", que os autores errôneamente definem como "degeneração gorda médio lobular"!

Insurge-se Rocha Lima contra esta interpretação e deixa claramente transparecer a mágoa de que tivesse ela partido do Instituto Oswaldo Cruz, cujo alicerce científico ajudara a construir. Impugna, em argumentação cerrada, (12, 14) os pontos de vista de Penna & Figueiredo, mostrando que as células de Councilman constituem apenas um dos componentes do quadro histopatológico da febre ama-

rela que, embora mais fáceis de apreciar, não podem substituir, pela sua inespecificidade e pela sua inconstância, o valor que só apresenta o conjunto das lesões.

Revela notar que Councilman, cujo trabalho, aliás, foi citado por Rocha Lima em sua comunicação feita em 1912 à Sociedade de Patologistas Alemães, efectivamente chamou a atenção para o fato de não parecer a “degeneração gorda” constituir a lesão mais importante da febre amarela, e descreveu a existência de massas hialinas, fortemente eosinófilas, provenientes de necrose celular, no fígado e no rim. Excelente pesquisador que era, assinalou desde logo Councilman que tais corpúsculos eosinófilos não eram específicos da febre amarela, pois encontravam-se também em casos de cirrose, envenenamento pelo fósforo e na atrofia amarela aguda do fígado. Councilman também não estabeleceu a independência dos processos de esteatose e de necrose, referindo-se à degeneração gorda como possível estágio ulterior à necrose.

Comentando o assunto, assim se exprime Rocha Lima em um de seus escritos: “Admite-se que Councilman e eu tenhamos visto a mesma cousa e, como precedeu-me, cabe-lhe a prioridade. Confessando que o achado é diferente, essa prioridade seria insustentável. Pois bem: duas pessoas colocadas em uma encruzilhada, uma diz: êste é o caminho, eu o reconheço; outra diz: êste não é o caminho, há muitos assim. Verifica-se que de fato o caminho é êste. Mas em vez de dizer: acertou quem reconheceu o caminho e errou quem não o reconheceu, dá-se a êste o mérito da descoberta, embora êle honestamente tenha contestado o valor diagnóstico do seu achado.

“A verdade é que não errou êste, nem acertou aquele, mas aquele só viu uma parte insuficiente para o diagnóstico e êste estabeleceu o quadro completo segundo o qual êsse diagnóstico é possível, como foi comprovado por mais de 100.000 exames”.

A outra contestação do valor do trabalho de Rocha Lima veio de um médico da marinha alemã W. H. Hoffmann, domiciliado em Havana, Cuba. Embora, como vimos, o achado de concreções calcáreas nos túbulos renais tenha sido assinalado por Rocha Lima em 1912, Hoffmann, em 1924, descreveu a ocorrência de cilindros calcáreos e o seu valor diagnóstico na febre amarela, divulgando essa pseudo-descoberta em numerosos trabalhos, publicados em diferentes países e em várias línguas. A lesão hepática que, para Hoffmann, seria constituída pela “distribución regular de las células necróticas limitadas unicamente a la zona intermédia del acino” ⁽¹⁵⁾, teria importância secundária.

Em 1928, porém, sem qualquer esclarecimento e sem qualquer fase intermediária, Hoffmann renova uma onda de artigos sobre o diagnóstico histopatológico da febre amarela e passa a adotar o critério de Rocha Lima, embora sem qualquer referência aos seus trabalhos, relegando, desta vez, a verificação dos cilindros calcáreos a um segundo plano ⁽¹⁶⁾.

As tentativas de depreciação de seu trabalho provocaram-lhe, de início, forte reação. Mais tarde, porém, passou a encarar o assunto com a devida serenidade, fortalecido pela convicção de que o tempo haveria, cada vez mais, de acumular fatos em seu favor: “Acertei, porém, em subir calmamente a uma altura de tranqüilidade e indiferença, que me permite hoje ver a humanidade mover-se e entrechocar-se com a mesma equanimidade e o mesmo alheamento com que observo a movimentação e o entrecchoque de microorganismos no campo do microscópio. Tenho apenas o cuidado de evitar que me contaminem os dedos, porque assim quase perdi a vida levando a uma mucosa riquétias do tifo exantemático que havia alegremente contemplado ao microscópio em preparado a fresco”.

“Em que se observa que êsse enquistamento da sensibilidade para a deturpação de acontecimentos e observações científicas, quando fora do alcance da polícia de costumes ou do clamor público, como foi o mato longínquo e raramente atingido da histopatologia da febre amarela, permite encarar com o devido humorismo um dos casos mais inacreditáveis do nosso “wild west”.

TIFO EXANTEMÁTICO — A descoberta do agente etiológico do tifo exantemático é a obra princeps de Rocha Lima. Para bem avaliar o mérito de seu trabalho, convém que nos reportemos ao ano de 1915 — quando, comissionado pelo governo alemão, Rocha Lima iniciou suas pesquisas num campo de prisioneiros russos e franceses em Kottbus, uma cidade alemã, não muito distante de Berlim, situada próxima à linha Oder-Neisse, atual fronteira com a Polônia.

Três eram os micróbios mais acreditados nesta ocasião entre os numerosos já indiciados como causadores do typhus epidêmico: 1) o *Proteus* x 19, de Weil & Felix, que pela sua aglutinação específica, de incontestável valor diagnóstico, classificava-se como forte concorrente; 2) a bactéria anaeróbia (*B. typhi exanthematici*) descrita em 1915 por Plotz, Olitsky & Baehr, também apoiada em múltiplas e aparentemente específicas provas de imunidade, e, finalmente, 3) a idéia fortemente defendida por Charles Nicolle pela qual o tifo exantemático era produzido por um vírus.

Quanto a corpúsculos semelhantes a riquetsias, haviam sido assinaladas em 1909 por Ricketts no sangue de doentes com febre maculosa e por Ricketts & Wilder (1910) em esfregaços de sangue de casos de typhus e em esfregaços de piolhos alimentados em tais pacientes. Ricketts, entretanto, não ousara afirmar o papel etiológico dos corpúsculos cocobacilares por êle observados, pois também os havia encontrado em piolhos normais: *It is clear in our mind that the grounds are not sufficient for claiming an etiologic role on the part of the organism described*".

É natural que esta curta e inexpressiva comunicação de Ricketts tenha ficado sem repercussão, mesmo no ambiente norte-americano, onde Plotz, Olitsky & Baher acabavam de comunicar os seus achados relativos ao *B. typhi-exanthematici*.

Em 1913, na Sérvia, Prowazek também encontrara corpúsculos semelhantes aos de Ricketts nos leucocitos de doentes de typhus. Mas, como tais corpúsculos eram raros, como sempre o são no sangue e nos tecidos dos pacientes, absteve-se Prowazek de emitir opinião sobre a sua natureza e a sua significação etiológica.

Ao iniciar suas atividades em Kottbus, em dezembro de 1914, Rocha Lima colhe os piolhos dos primeiros cadáveres autopsiados e, não dispondo ainda de animais de experiência, limita-se a examinar esfregaços de órgãos ou de piolhos, em preparadose fresco ou corados pelo Giemsa. Tem logo sua atenção voltada para a ocorrência de numerosíssimos corpúsculos, aos quais haveria mais tarde de denominar riquetsias. Duas semanas após junta-se a Rocha Lima o seu colega Prowazek, protozoologista do "Tropeninstitut", o qual, tomando a si o exame a fresco do conteúdo intestinal dos piolhos, logo se infecta, adoecendo três semanas depois e vindo a falecer a 17 de fevereiro de 1915.

Rocha Lima se infecta também e, convalescente, volta ao Instituto de Hamburgo, onde se empenha no exame histológico do material de piolhos colhido em Kottbus. O assunto havia caído, por assim dizer, em ponto morto, pois, tal como acontecera a Ricketts & Wilder cinco anos atrás, Rocha Lima e Prowazek haviam também encontrado riquetsias tanto nos piolhos colhidos em cadáveres de typhus como em piolhos normais.

Mas, no laboratório de Rocha Lima em Hamburgo, sua hábil colaboradora Sikora consegue desenvolver excelente técnica para a obtenção de cortes de piolhos. Incidentemente, a colaboração de Hil-da Sikora, a quem incumbia o trabalho técnico referente aos piolhos no Laboratório de Patologia do "Tropeninstitut" foi preciosa a Ro-

cha Lima que, além dos trabalhos relativos à infecção experimental, devia ocupar-se com o trabalho de campo, colhendo o material necessário às verificações e experiências a serem completadas em Hamburgo.

Nos cortes de piolho faz, então, Rocha Lima uma descoberta de importância fundamental, a saber que, enquanto nos piolhos normais as riquetsias são extracelulares, nos piolhos infectados encontram-se células epiteliais repletas de riquetsias que só pelo arreben-tamento das células são liberadas na luz do intestino.

A partir desta verificação, firma-se no espírito de Rocha Lima a convicção do papel etiológico das riquetsias, pois estava anteriormente inclinado a adotar o ponto de vista de Nicolle, o grande pesquisador francês por quem nutria especial admiração e que descobrira dois fatos fundamentais relativos ao typhus — a transmissão pelo piolho e a infecção "termométrica" da cobaia. Tão impressionado estava com os trabalhos do cientista francês que, logo ao chegar a Kottbus, empreendera só ou em colaboração com Prowazek uma série de experiências relativas à filtrabilidade do vírus exantemático (inoculações em rhesus em cobaias).

Os resultados constantemente negativos de suas experiências de filtração e a diferenciação que conseguira estabelecer entre as riquetsias de piolhos normais e as de piolhos infectados geraram em seu espírito a convicção de que a estas últimas deveria caber a etiologia do tifo exantemático. Em fins de 1915, trabalhando em Wloclawek, na Polônia, verifica que piolhos normais, criados no laboratório em Hamburgo e alimentados em doentes de typhus, ao contrário dos testemunhas alimentados em pessoas sãs ou atacadas de outras doenças, adquiriam tanto a virulência verificável pela inoculação em cobaia, como a riquetsia intracelular demonstrável, ao exame histológico, nas células do epitélio intestinal.

Esse paralelismo entre a virulência do material e a presença de riquetsias, verificado em múltiplas condições experimentais, é que veio finalmente arraigar em Rocha Lima a convicção de que as riquetsias intracelulares do piolho eram, de fato, a causa do tifo exantemático.

Deu-lhes, então, o nome de *Rickettsia prowazeki*, em homenagem aos dois pesquisadores que haviam perdido a vida ao procurar resolver o problema da etiologia do tifo exantemático. Suas primeiras comunicações aparecem em 1916 nos Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. e no Centralbl. f. Path. Anat.. Em julho de 1916, comparece ao Congresso Alemão de Medicina Interna reunido em Varsóvia

e lá comunica seus resultados. Tratava-se de um congresso de medicina de guerra e o objeto principal da reunião, como esclareceu o organizador do congresso, Prof. His, era o de reunir os defensores de várias etiologias do tifo exantemático, a fim de provocar amplo debate entre êles.

Rocha Lima retira-se irritado do Congresso, pois julga injusto o tratamento dispensado ao seu trabalho, particularmente pelo fato de ter-lhe sido dada a palavra após uma comunicação de Töpfer, cujos trabalhos eram posteriores e não totalmente independentes dos seus e por não lhe ter sido concedido tempo para a projeção de seus diapositivos.

Por ocasião da publicação dos Anais do Congresso é incluído apenas um curto auto-referate que se destinava à imprensa leiga, em contraste com um longo resumo da comunicação de Töpfer.

Rocha Lima dirige-se, então, à direcção do Congresso e solicita que o seu trabalho seja anunciado apenas pelo título, com “conferência não pronunciada”. Isto provoca viva correspondência entre Rocha Lima e His, correspondência esta que tive agora o privilégio de conhecer nos originais.

A atitude firme e coerente de Rocha Lima faz, por fim, recuar os organizadores do congresso que resolvem incluir um longo referate de sua comunicação precedendo a de Töpfer, isto é, invertendo a ordem em que os trabalhos haviam sido apresentados.

Para justificar a sua atitude, His argumenta que sabia ser anterior e mais importante que a de Töpfer a comunicação de Rocha Lima, e que se a colocara depois fôra apenas em virtude do hábito consagrado de servir-se um vinho velho após um novo: “Ich wusste aus Ihrer Veröffentlichung, dass Sie diesen Gebilden schon lange auf der Spur seien und setzte Ihren Vortrag an zweite Stelle, wie man den älteren Wein nach dem jüngeren zu reichen pflegt. Ao que que lhe responde irônicamente Rocha Lima: “... ich nicht ahnte, dass hierbei die Regeln des Weinschenkens massgebend sein könnten”.

Na literatura alemã a prioridade de Rocha Lima não foi, porém, jamais discutida. Há apenas na literatura americana certa tendência a salientar o achado de Ricketts & Wilder (1910) e de atribuir importância relativamente secundária à contribuição de Rocha Lima. Contra esta tendência rebela-se Rocha Lima em publicação feita em 1951 na Revista Brasileira de Medicina e que fôra planejada como assunto da conferência que devera realizar como Presidente da Seção de Riquetsias do Congresso Internacional de

Microbiologia realizado em New York em 1939, ao qual não lhe foi, entretanto, facilitada a oportunidade de comparecer.

O tempo de que disponho não me permite analisar mais pormenorizadamente a contribuição de Rocha Lima ao problema da etiologia do typhus: a diferenciação entre a *R. prowazeki* e outras riquetsias encontradas no piolho: *R. pediculi*, *R. wolhynica*, *R. rochalimai*, *R. melophagi*; a coincidência do período infeccioso do piolho e os achados de riquetsias; a permanência da infecciosidade do piolho e da dos achados de riquetsias até 24 dias após o repasto infectante, estabelecendo a noção fundamental sob o ponto de vista profilático de que se não há portadores humanos do vírus exantemático, os há de piolhos infectados, que se podem encontrar ainda em convalescentes; a coincidência da incubação no piolho em relação à sua virulência e à demonstração de riquetsias; o efeito da temperatura, isto é, a evidência de que acima de 32°C há muita riquetsia e alta infecciosidade, ao contrário do que se verifica a 24°C — fato que veio explicar satisfatoriamente a diminuta importância prática do piolho da cabeça, embora este também seja passível de infectar-se, etc.

Os trabalhos de Rocha Lima se estenderam ainda ao preparo de uma vacina com piolhos infectados, técnica depois aperfeiçoada por R. Weigl, e à obtenção de um soro terapêutico anti-vírus do piolho, cujos resultados práticos não puderam, entretanto, ser devidamente avaliados.

Além de tudo isso, ressalta ainda, na contribuição de Rocha Lima a importância que atribuiu às riquetsias como um grupo especial de microorganismos: “eine besondere Bakterienart oder Bakteriengruppe bezw. keine Bakterien, sondern ein bakterienähnlicher Mikroorganismus” (Arch. f. Schiffs- . Tropenhyg.), 20 : 20, (1916) — o que situa a sua descoberta também como um achado particularmente importante no domínio da Biologia Geral.

A limitação de tempo me obrigou a reduzir a apreciação da obra científica do Prof. Rocha Lima a dois de seus campos de atividade. Múltiplos foram, porém, os seus interesses e suas pesquisas se estenderam a numerosos outros setores no domínio da medicina tropical, nos quais deixou sempre contribuição relevante, como no estudo da verruga peruana, das blastomicoses, da doença de Chagas, da febre hemoglobinúrica, da poradenite, etc.

Sua carreira como experimentador viu-se obrigado a interrompê-la em 1927, ao assumir o seu posto no Instituto Biológico de São Paulo. Embora tenha sempre acariciado a idéia de poder continuar os seus trabalhos entre nós, nunca conseguiu fazê-lo, absorvido

que foi por seus deveres administrativos e pela luta constante que teve de manter durante longos anos contra as ameaças de destruição do nosso Instituto. E é por isso e pelo muito com que contribuiu para o desenvolvimento do ambiente científico desta casa, que jamais lhe poderemos ser suficientemente gratos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Sodré, A. & Couto, M., "Das Gelbfieber", In Nothnagel, Spez. *Pathol. u. Ther.*, vol. 5, Parte 4:1, 1901.
- (2) Marchoux, E., Salimbeni & Simond, P. B., *Ann. Inst. Pasteur*, 17:104, 1903.
- (3) Marchoux, E. & Simond, P. B., *Ann. Inst. Pasteur*, 20:16, 104, 161, 1906.
- (4) Rocha Lima, H. da, Vortrag am 20. Sept. 1911 vor der Tropenmed. Gesellschaft, *Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg.*, 16:1, 192-199, 1912.
- (5) Rocha Lima, H. da, Verhandl. d. deutschen pathol. Gesellschaft, XV. Tagung, Strassburg, 163-182, 15-17. April 1912.
- (6) Sinval Lins, *Arch. Hygiene*, 3:1, 1929.
- (7) Soper, F. L., Rickard, E. R. & Grawford, P. J., *Am. J. Trop. Med.*, 19:1934.
- (8) Soper, F. L., Bull. trimestriel de l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations, 5, 1936.
- (9) Rocha Lima, H. da, "Gelbfiebergruppe", In Prowazeks Handbuch der pathogenen Protozoen, 1914.
- (10) Rocha Lima, H. da, *Rev. Médica de Hamburgo*, 2:336, 1921.
- (11) Penna, O. & Figueiredo, B., *Fôlha Médica*, 15 de Julho de 1929.
- (12) Rocha Lima, H. da, *Sciencia Médica*, 7:10, 1929.
- (13) Penna, O. & Figueiredo, B., *Rev. Bras. Med. Pharmacia*, 4:19-31, 1929.
- (14) Rocha Lima, H. da, "Complemento á refutação científica publicada no n.º 10 da *Sciencia Médica* de 1929". Não publicado.
- (15) Hoffmann, W. H., *Rev. Med. y Cir. Habana*, 29, 1924.
- (16) Hoffmann, W. H., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1, 1928.

INFESTAÇÃO DAS BROCAS MARÍTIMAS
TEREDO SP, *BANKIA SP* E *MARTESIA STRIATA*
LINNE, EM TACOS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*
(BERT) O. KUNTZE, TRATADOS COM INSETICIDAS

POR

S. Franco do Amaral

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 8 figuras no texto e estampas 1-5

Este trabalho foi realizado para atender o interesse do Instituto de Pesca Marítima da cidade de Santos, que não tem encontrado, nos métodos usuais, resultados satisfatórios no controle das brocas marítimas *Teredo sp*, *Bankia sp* e *Martesia striata* Linne, que constituem o mais sério problema dos cascos das embarcações de madeira, bem como de toda estrutura de madeira que acha-se submersa no mar.

O apoio que recebemos do Diretor daquela instituição e a falta de dados sobre este assunto na literatura brasileira, animaram-nos a realizar este trabalho não obstante a nossa ignorância sobre a matéria e o meio ambiente, em que se processou, diferir bastante daquele da Entomologia Econômica, onde estamos mais acostumados a agir. Nestas condições, os resultados que apresentamos poderão não constituir novidade para aqueles melhor identificados com este velho problema de âmbito mundial, com o qual não tivemos oportunidade de nos familiarizar, dada as dificuldades para reunirmos os trabalhos sobre o assunto, por ventura já publicados em outros países. Entretanto, acreditamos que estes dados poderão servir para comprovar outras experiências que, nestes moldes, já tenham sido realizadas ou como orientação de nossos futuros ensaios.

MATERIAL E MÉTODO

Este ensaio foi instalado em 9-8-52 na margem da ilha de Santo Amaro que forma o estuário da Ponta da Praia, próximo do cais da balsa do Guarujá e do estaleiro Napesca e terminado em 19-3-53.

Na sua instalação utilizamos tacos de pinho, *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze, com as dimensões de 25 x 10 x 2,5 cm. Após os tratamentos, esses pequenos pedaços de madeira foram fixados, em disposição ao acaso, em 5 armações de ferro de 2,20 x 1,10 m,

que constituíram os 5 blocos, cada qual contendo todas as modalidades de tratamento e as respectivas testemunhas (Estampa 1, fig. A).

Cada armação de ferro compôs-se de 5 varões horizontais, distanciados 20 cm um do outro e cêrca de 70 cm do chão. Em cada um dêsses varões foram fixados 6 tacos no seu sentido longitudinal, de modo a ficarem distanciados, entre si, de 10 cm. Essas armações, assim preparadas, foram colocadas no mar na hora da baixamar, de maneira a ficarem submersas, nessas ocasiões, uns 20 cm aproximadamente. Uma vez por mês foram retiradas para o exame do estado de conservação e de fixação dos tacos nos respectivos varões, (Estampa 1, fig. B). Em 19-3-53, julgamos oportuno encerrarmos as nossas observações, em virtude das testemunhas estarem quasi que totalmente destruidas e a ponto de se desprenderem das armações de ferro, (Estampa 2, fig. A).

Os 150 tacos de pinho de duas qualidades provenientes do “cerne” e do “alburno” da *A. angustifolia* (BERT) O. KUNTZE, que aqui denominamos de “rosado” e “branco” respectivamente, foram tratados com vários inseticidas e alguns produtos, nas combinações especificadas na tabela 1.

Os inseticidas Cafeno clorado técnico (100%), DDT técnico (100%), BHC (90% de isômero gama) e 2.4 Dinitro-o-fenol técnico (80%), foram utilizados na quantidade de 300 g, dissolvidas em 2.400 cm³ de benzol, sendo que o Clordane emulsionado (74%) foi empregado na razão de 300 cm³ para a mesma quantidade daquele dissolvente.

Os tacos de madeira destinados aos tratamentos com êsses inseticidas, ficaram submersos, nessas soluções assim preparadas, pelo espaço de 30 horas. Após êsse período foram retirados dessas soluções, deixados a secar no ambiente do laboratório e anotada a quantidade de solução absorvida pelos tacos “rosado” e “branco” (tab. 2). Quando os tacos apresentaram-se aparentemente sêcos, procedemos a pintura com Tinta B, daqueles destinados a combinação: *Inseticida + Tinta B*.

O Tanino utilizado, foi extraído da casca de “aroeira-vermelha”, *Schinus terebentifolius* Raddi (800 g de casca fervida em 4 litros de água durante 4 horas). Nêsse volume de 4 litros, os tacos de madeira destinados a êste tratamento, ficaram submersos pelo mesmo espaço de tempo de 30 horas.

A aplicação do Enxofre foi feita após a sua fusão em estufa a 140°C, no qual os tacos ficaram submersos pelo espaço de 2 horas.

O óleo de creosoto e as Tintas B e M foram aplicadas, a pincel com 3 demãos.

TABELA 1

Relação dos produtos, quantidade e qualidade dos tacos de *A. angustifolia* (Bert) O. Kuntze e tratamentos

Produtos (*)	N.º de tacos	Qualidade dos tacos	Tratamentos
Canfeno clorado	5	Rosado	Canfeno clorado
	5	Rosado	Canfeno clorado + tinta B
	5	Branco	Canfeno clorado + tinta B
2.4 Dinitro-o-fenol	5	Rosado	2.4. Dinitro-o-fenol
	5	Rosado	2.4. Dinitro-o-fenol + tinta B
	5	Branco	2.4. Dinitro-o-fenol + tinta B
BHC	5	Rosado	BHC
	5	Rosado	BHC + tinta B
	5	Branco	BHC + tinta B
Clordane	5	Rosado	Clordane
	5	Rosado	Clordane + tinta B
	5	Branco	Clordane + tinta B
DDT	5	Rosado	DDT
	5	Rosado	DDT + tinta B
	5	Branco	DDT + tinta B
Tanino	5	Rosado	Tanino
	5	Rosado	Tanino + tinta B
	5	Branco	Tanino + tinta B
Enxofre	5	Rosado	Enxofre
	5	Rosado	Enxofre + tinta B
	5	Branco	Enxofre + tinta B
Óleo de Creosoto	5	Rosado	Óleo de creosoto
	5	Rosado	Óleo de creosoto + tinta B
	5	Branco	Óleo de creosoto + tinta B
Tinta M (**)	5	Rosado	Tinta M
	5	Branco	Tinta M
Tinta B (***)	5	Rosado	Tinta B
	5	Branco	Tinta B
—	5	Rosado	(Testemunhas)
	5	Branco	

(*) — no texto do presente trabalho, designaremos todos os produtos aqui especificados de inseticidas com excessão das tintas B e M.

(**) — tinta fornecida pelo Instituto de Pesca Marítima e utilizada na proteção dos cascos de suas embarcações.

(***) — tinta branca comum, adquirida no comércio.

TABELA 2

Quantidade de solução e de princípio ativo absorvido pelos tacos de pinho rosado e branco

INSETICIDA E QUANTIDADE UTILIZADA	Conc.	ABSORÇÃO MÉDIA			
		Cm ³ por taco		G de princípio ativo por taco	
		Rosado	Branco	Rosado	Branco
Canfeno clorado técnico (100%) 300 g em 2.400 cm ³ de benzol	12,5%	75	130,8	9,4	16,4
DDT técnico (100%) 300 g em 2.400 cm ³ de benzol .	12,5%	60	148,3	7,5	18,5
BHC (90% isômero gama) 300 g em 2.400 cm ³ de benzol	11,25%	38,9	128,3	4,4	14,4
2,4. Dinitro-o-fenol técnico (80%) 300 g em 2.400 cm ³ de benzol	10%	51,8	188,3	5,2	18,3
Clordane emulsionado (74%) 300 cm ³ em 2.400 cm ³ de benzol	9,25%	63,3	162,5	5,9	15,0
Enxofre em pó	100%	—	—	35	36

Os inseticidas BHC, DDT e 2,4 DINITRO-O-FENOL e o CANFENO CLORADO, que sob a forma sólida foram dissolvidos no benzol, na realidade atuaram em maiores concentrações daquelas mencionadas na tabela 2, em virtude da evaporação parcial do benzol por ocasião da retirada dos tacos daquelas soluções e secagem no ambiente do laboratório. Com a evaporação parcial daquele dissolvente houve também a cristalização de uma parte daqueles inseticidas e possivelmente a solidificação deste último na superfície dos tacos.

Por ocasião do término deste ensaio e retirada dos tacos do mar, verificamos, após sua limpeza e secagem na estufa, nova cristalização daqueles inseticidas e muito especialmente do DDT. (Estampa 3). Este fato vem demonstrar que após o tratamento desses tacos, secagem no ambiente do laboratório e submersão no mar por 7 meses e 10 dias, ainda havia, no interior dos tacos de pinho, uma certa porção de benzol e de inseticida em dissolução nesse dissolvente.

A menor quantidade de tacos de pinho "branco" incluída nesta experiência (tab. 1), nos impediu de avaliar o efeito dos inseticidas

em relação a qualidade da madeira sem a proteção da TINTA B. Não obstante essa deficiência, nos foi possível, todavia desdobrar este ensaio nas seguintes análises:

- Influência dos Inseticidas e do tipo de Tintas (tacos rosado tratados com inseticida, Tinta M e Tinta B).
- Influência dos Inseticidas e da Tinta B (tacos rosado tratados com inseticida e inseticida + tinta B).
- Influência dos Inseticidas e da Qualidade da Madeira (tacos rosado e branco tratados com inseticida + Tinta B).
- Influência da Qualidade da Madeira e do Tipo de Tinta (tacos rosado e branco tratados com tinta M e tinta B).

ESTIMATIVA DA INFESTAÇÃO

Para a estimação da infestação da *M. striata*, *Bankia* sp e *Teredo* sp, o que nem sempre é possível de ser avaliado por um simples exame externo da madeira, os tacos, após a necessária limpeza e secagem na estufa, foram serrados no sentido longitudinal, em 3 partes iguais com 7 mm de espessura (Estampas 4 e 5, figs. A, B, C, D, E e F).

Na avaliação dos prejuízos provocados pela *M. striata*, consideramos apenas o número de orifícios ocasionados por esta broca, no volume total dos tacos, ao passo que para o *Teredo* sp e *Bankia* sp, levamos em conta o volume da madeira destruída somente no terço médio desses tacos. Este critério para o *Teredo* sp e *Bankia* sp, que são as principais e mais sérias brocas marítimas, fundamentou-se na hipótese desse estrago ou sua ausência nêsse terço médio, representar uma proteção de $\frac{1}{3}$ ou $\frac{2}{3}$ da espessura dessas madeiras si utilizadas no costado das embarcações, visto que, nesta situação, apenas uma face da madeira estaria em contacto com a água e não todas as faces como aconteceu nêste ensaio, onde os tacos submersos no mar e com todas as suas superfícies em contato com a água, possibilitaram, certamente, estas duas brocas atingir mais facilmente a parte central desses tacos.

Para o cálculo do volume da madeira destruída utilizamos a formula πR^2H levando em conta o diâmetro e o comprimento das galerias ocasionadas pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp.

Este método, si por um lado nos permitiu um julgamento mais exato dos prejuízos do *Teredo* sp e *Bankia* sp., não nos facultou todavia, uma apreciação segura quanto aos danos ocasionados pela *M. striata*. Aquelas duas brocas, muito mais destrutivas, caminhando não só no sentido longitudinal da madeira, mas também nas direções

diagonal e transversal, podem mascarar, como aconteceu nos tacos fortemente atacados, os orifícios característicos da *M. striata*, que por sua vez perfura a madeira quasi que exclusivamente no sentido transversal às suas fibras. Nestas condições, os danos ocasionados pela *M. striata* puderam ser considerados apenas nos tacos pouco atacados pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp. (Estampas 4 e 5, figs. A, B, C, D, E e F).

ANÁLISE DOS RESULTADOS

A ausência de infestação em algumas das 5 repetições não nos permitiu analisar os dados estatisticamente e chegar a uma conclusão segura quanto ao efeito dos diversos tratamentos, principalmente em relação a *M. striata*, que além dêsse fato, teve os sintomas, do seu ataque, mascarados nos tacos fortemente infestados pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp. Todavia, com relação a estas duas brocas, não obstante a irregularidade de suas infestações, os resultados apresentaram-se bastante indicativos pelo menos em 2 dos 4 ensaios (figs. 1 e 2). A total destruição ocorrida nas TESTEMUNHAS e nos tacos tratados com BHC, DDT, TANINO e ENXOFRE, das 5 repetições, nos leva a acreditar que a irregularidade dessa infestação nos demais tratamentos, não foi uma simples decorrência de uma pequena ou mal distribuída população do *Teredo* sp e *Bankia* sp no campo do ensaio, mas devido a ação dos próprios tratamentos. Admitindo esta hipótese e analisando as figs. 1 e 2, verificámos o seguinte:

— no ensaio relativo a *Influência dos Inseticidas e das Tintas* (tacos rosado tratados com inseticida, tinta B e tinta M — figura 1), sobressairam-se os tratamentos 2.4. DINITRO-O-FENOL (B1), TINTA B (J1), ÓLEO DE CREOSOTO (H1) e o CANFENO CLORADO (A1), sendo que o BHC (C1), o TANINO (F1) e o ENXOFRE (G1), foram totalmente nulos, funcionando como a TESTEMUNHA (I1).

— no ensaio relativo a *Influência dos Inseticidas e da Tinta B* (tacos rosado tratados com inseticida e inseticida + tinta B — figura 2), os tratamentos BHC (C1), TANINO (F1) e ENXOFRE (G1), quando aplicados sem a tinta B, não tiveram qualquer ação protetora, funcionando como a TESTEMUNHA (I1). A adição da tinta B aumentou a eficiência do BHC (C2), CLORDANE (D2), DDT (E2), TANINO (F2) e do ENXOFRE (G2), sem contudo su-

perar a eficiência da TINTA B (I2), o que parece indicar que êsses inseticidas prejudicaram, com excessão do CLORDANE (D2), a ação dessa tinta. Os demais inseticidas, 2.4. DINITRO-O-FENOL (B1 e B2). CANFENO CLORADO (A1 e A2) e o OLEO DE CREOSOTO (H1 e H2) situaram-se praticamente num mesmo plano de eficiência independentemente da adição da Tinta B, com a qual ou para a qual, parece não ter havido qualquer incompatibilidade.

Quanto aos outros dois ensaios relativos a qualidade da madeira em relação aos inseticidas e as tintas, (figs. 3 e 4), não nos foi possível um julgamento da influência de qualquer um daqueles fatores.

Em relação a *M. striata*, figuras 5, 6, 7 e 8 verificamos a sua maior incidência nos tacos tratados com DDT e BHC (figs. 5, 6 e 7) sem contudo podermos apreciar a eficiência dos diversos tratamentos, quer pela ausência de sua infestação em algumas repetições, quer pela mascaração do seu ataque, ocasionada pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp.

CONCLUSÕES

Não obstante a ausência de infestação do *Teredo* sp e *Bankia* sp, em algumas das 5 repetições e a impossibilidade de procedermos a análise estatística dos dados experimentais, encontramos indícios da ineficiência do BCH, DDT, TANINO e ENXOFRE, no contróle dessas brocas (figs. 1 e 2).

Com relação a *M. striata*, o BHC e o DDT foram os tratamentos que mostraram-se com maior infestação. Todavia, em virtude da ausência dessa broca em algumas repetições e as dificuldades para determinarmos sua infestação nos tacos fortemente atacados pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp (Estampa 5, figs. D, E e F), não pudemos concluir quanto a ineficiência desses dois inseticidas e ação dos demais tratamentos experimentados.

E' possível que o período de 7 meses e 10 dias de submersão e de exposição dos tacos ao ataque do *Teredo* sp, *Bankia* sp e *M. striata*, tenha sido curto para nos permitir um julgamento do efeito dos inseticidas que mostraram-se aparentemente mais eficientes no contróle dessas brocas, principalmente quando em comparação com a TINTA M e o ÓLEO DE CREOSOTO que representam os produtos mais usuais no nosso meio. Diante desta situação, outros ensaios tornam-se necessários para o esclarecimento de vários pontos não devidamente solucionados no presente trabalho.

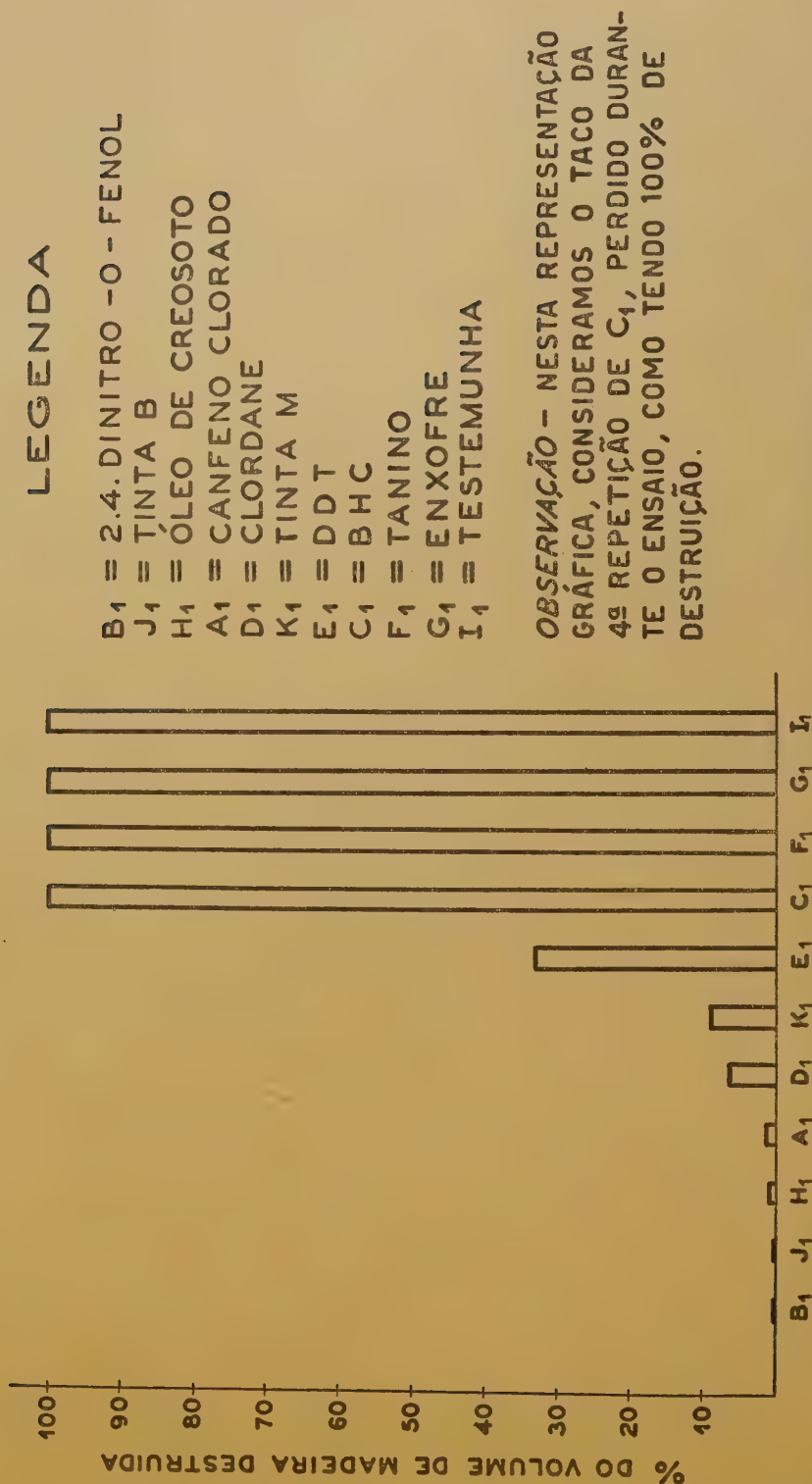
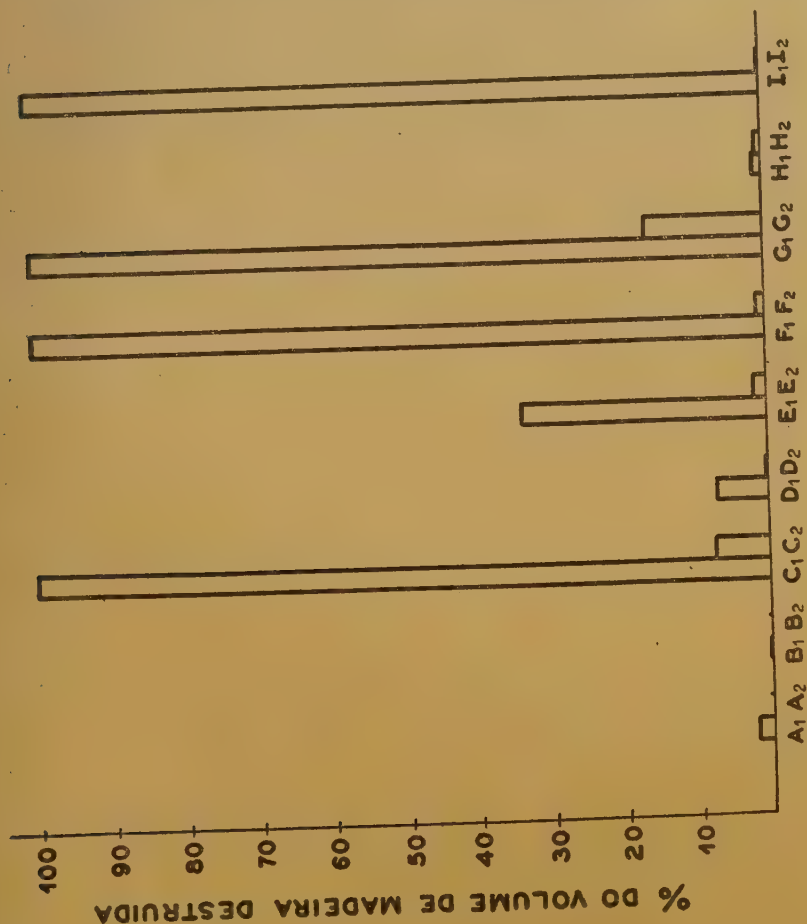


Figura 1 — Representação gráfica do volume de madeira destruída pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp nos tacos "rosado" tratados com inseticida, Tinta B e Tinta M - Influência dos inseticidas e das tintas.

LEGENDA

- A₁ = CANFENO CLORADO
 A₂ = CANFENO CLORADO + TINTA B
 B₁ = 2.4. DINITRO - O - FENOL
 B₂ = 2.4. DINITRO - O - FENOL + TINTA B
 C₁ = BHC
 C₂ = BHC + TINTA B
 D₁ = CLORDANE
 D₂ = CLORDANE + TINTA B
 E₁ = DDT
 E₂ = DDT + TINTA B
 F₁ = TANINO
 F₂ = TANINO + TINTA B
 G₁ = ENXOFRE
 G₂ = ENXOFRE + TINTA B
 H₁ = ÓLEO DE CREOSOTO
 H₂ = ÓLEO DE CREOSOTO + TINTA B
 I₁ = PINHO ROSADO (TESTEMUNHA)
 I₂ = PINHO ROSADO + TINTA B



OBSERVAÇÃO — IDEM QUANTO A FIG. 1

Figura 2 — Representação gráfica do volume de madeira destruída pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp nos tacos "rosado" tratados com Inseticida e Inseticida + Tinta B - Influência dos inseticidas e da tinta B.

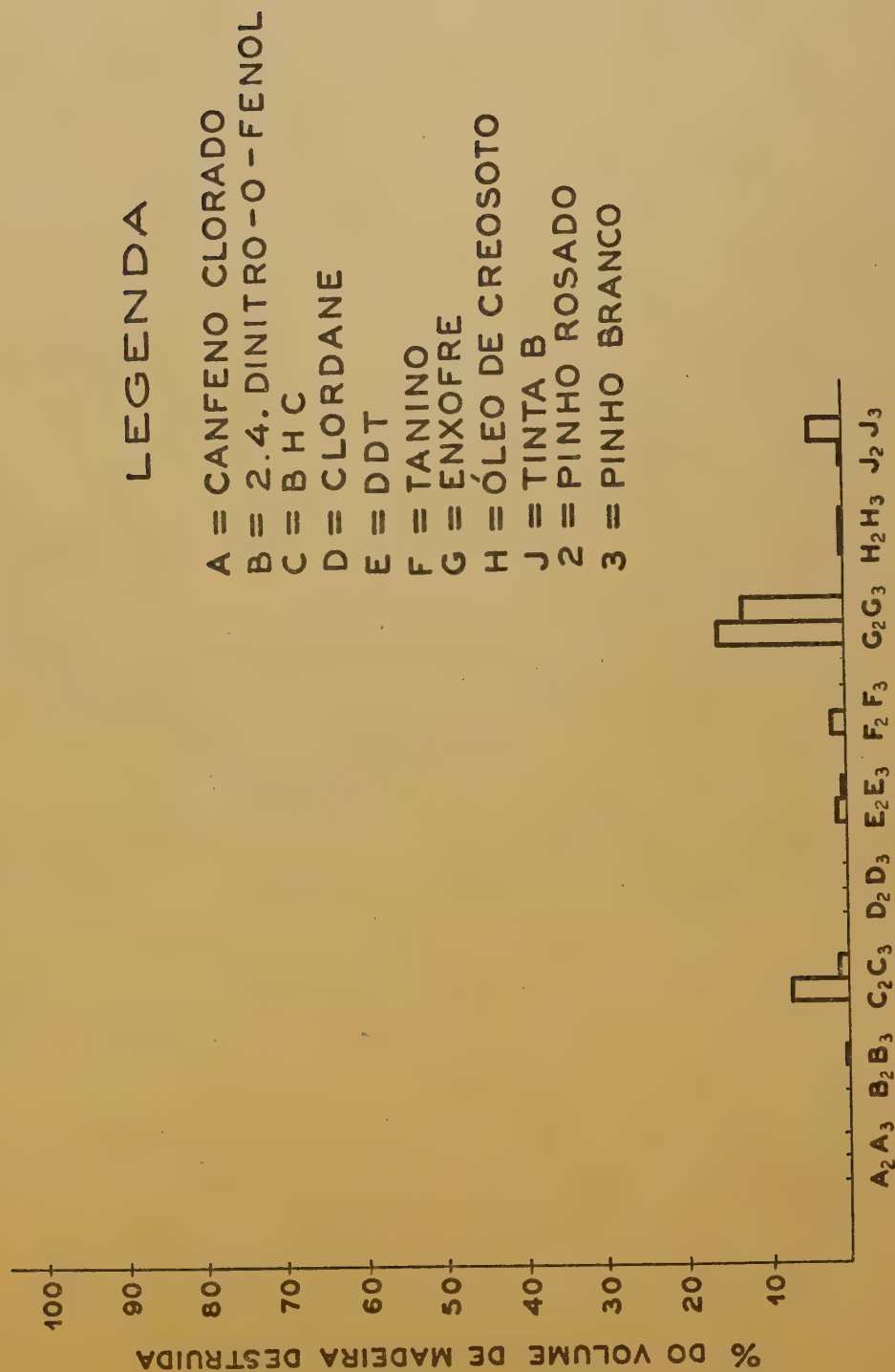


Figura 3 — Representação gráfica do volume de madeira destruída pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp nos tacos “rosado” e “branco” tratados com Inseticida + Tinta B - Influência dos inseticidas e da qualidade da madeira.

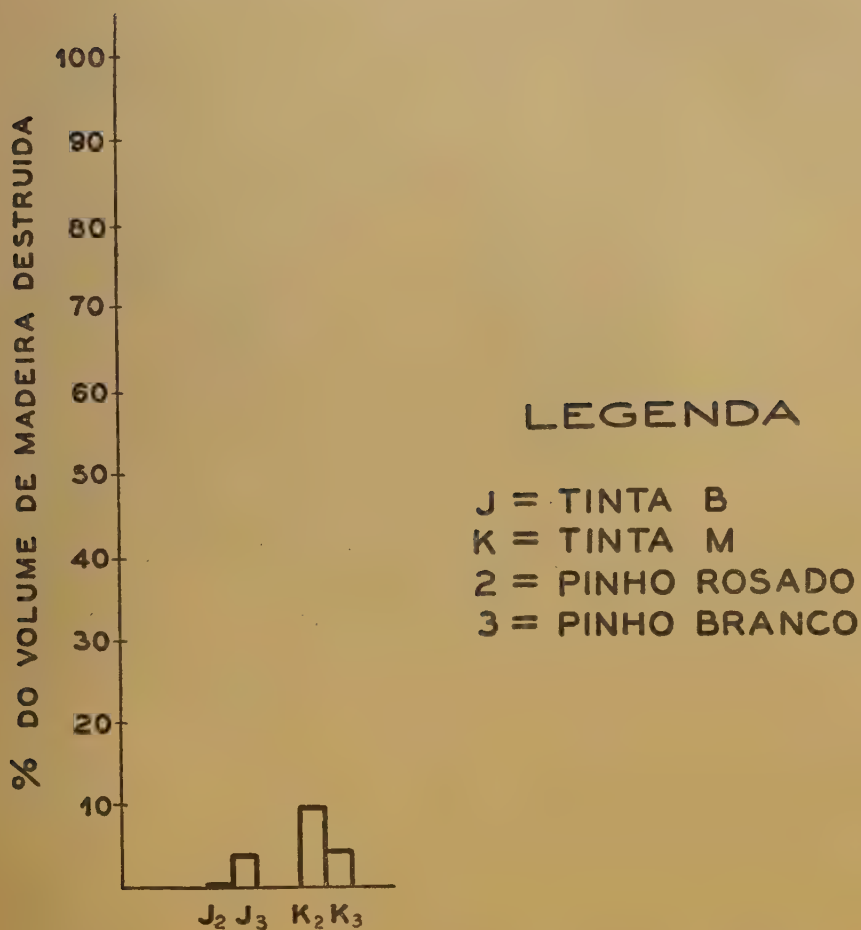


Figura 4 — Representação gráfica do volume de madeira destruída pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp nos tacos “rosado” e “branco” tratados com tinta B e Tinta M - Influência da qualidade da madeira e da tinta.

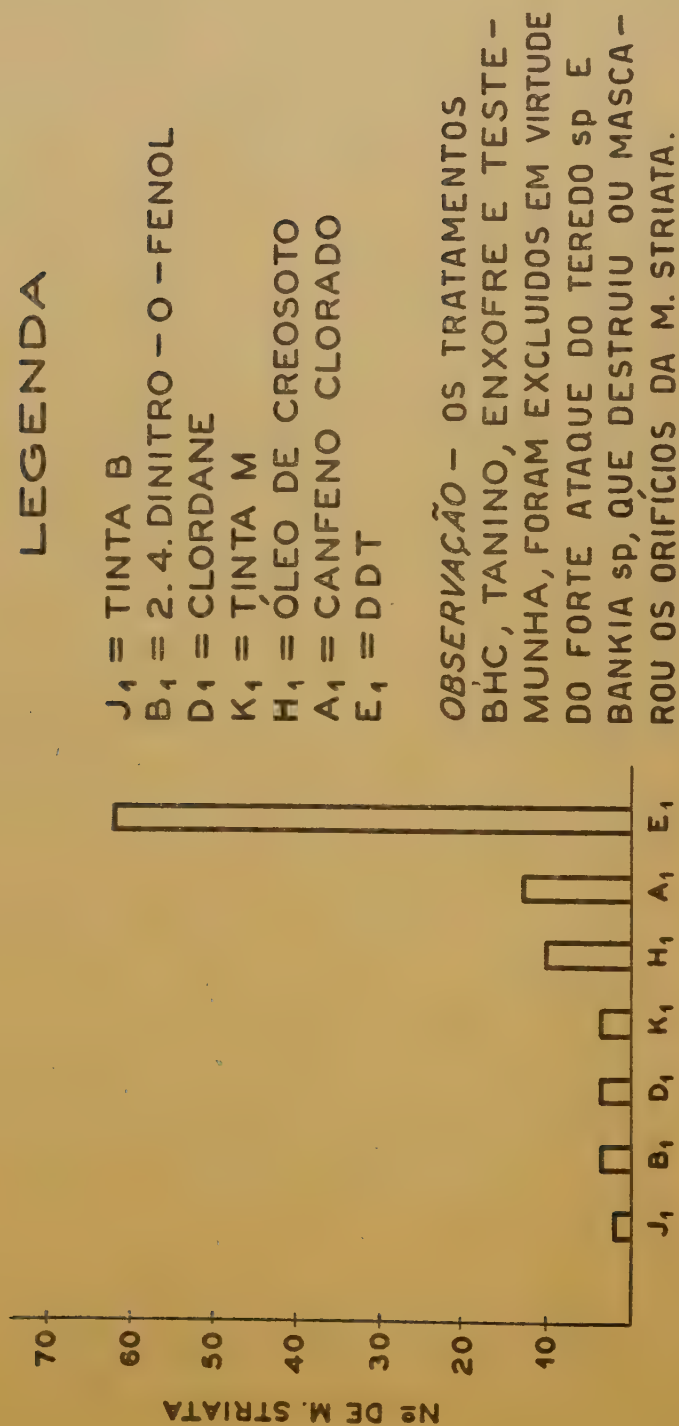


Figura 5 — Representação gráfica da infestação da *Martesia striata* Linne, nos tacos "rosado" tratados com Inseticida, Tinta B e Tinta M - Influência dos inseti-
 das e das Tintas.

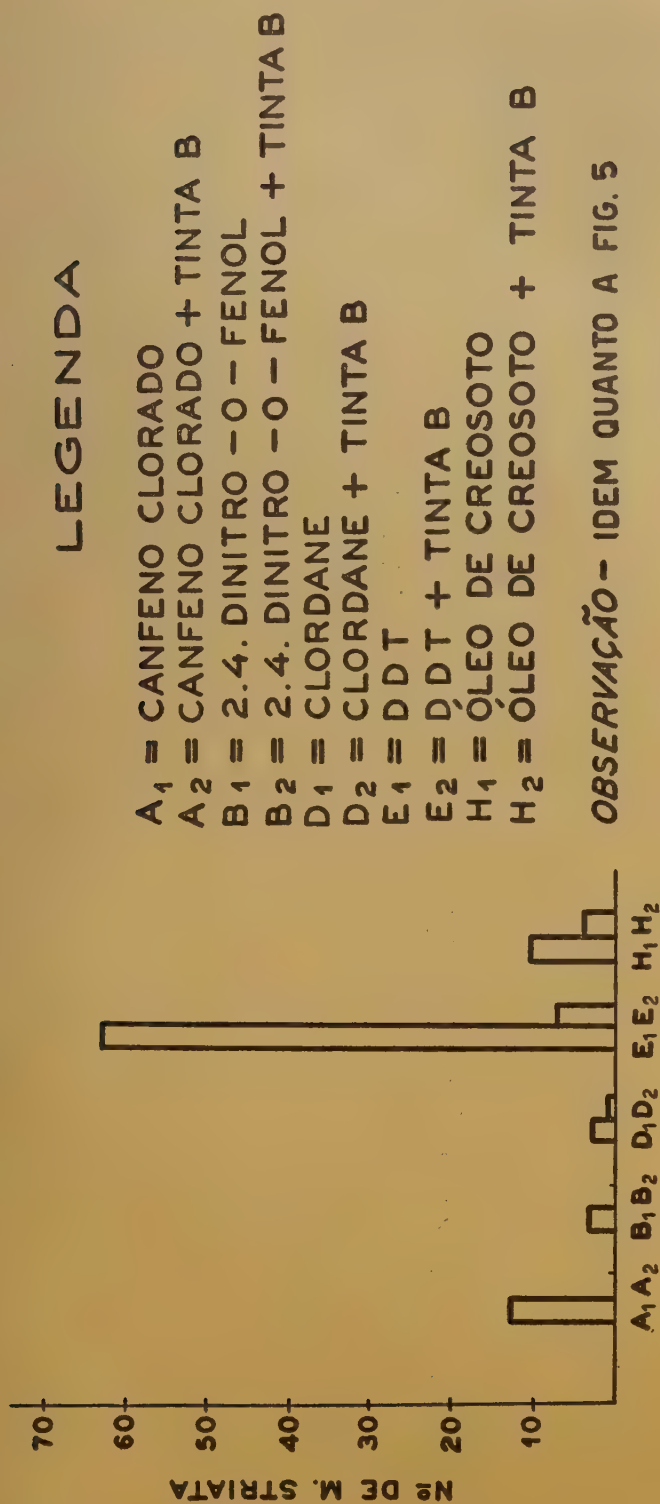


Figura 6 — Representação gráfica da infestação da *Martesia striata* Linne, nos tacos "rosado" tratados com Inseticida e Tinta B - Influência dos inseticidas e da Tinta B.



Figura 7 — Representação gráfica da infestação da *Martesía striata* Linne, nos tacos “rosado” e “branco” tratados com Inseticida + Tinta B - Influência dos inseticidas e da qualidade da madeira.

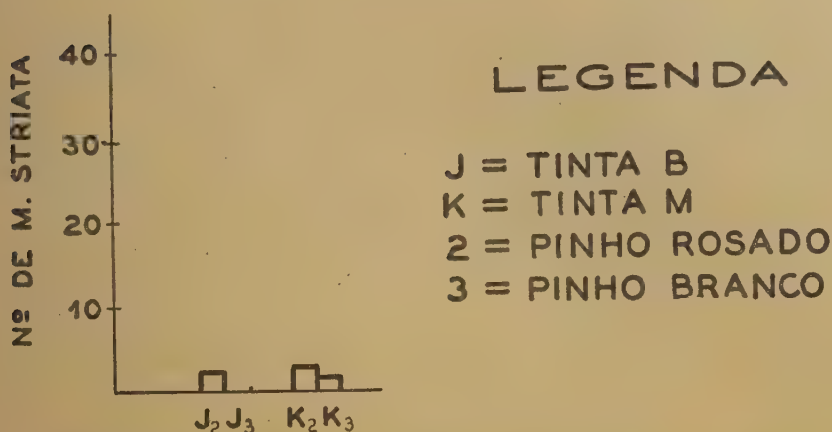


Figura 8 — Representação gráfica da infestação da *Martesias striata* Linne, nos tacos “rosado” e “branco” tratados com as Tintas B e M - Influência das tintas e da qualidade da madeira.

SUMÁRIO

Este trabalho foi realizado para atender o interesse do Instituto de Pesca Marítima da cidade de Santos, que não tem encontrado, nos métodos usuais, resultados satisfatórios no controle das brocas marítimas *Teredo* sp, *Bankia* sp e *Martesias striata* Linne, que constituem o mais sério problema dos cascos das embarcações de madeira, bem como de toda estrutura de madeira que acha-se submersa no mar.

150 tacos de pinho, com as dimensões de 25 x 10 x 2,5 cm, provenientes do “cerne” e do “alburno”, da *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KUNTZE, que denominamos de “rosado” e “branco” respectivamente, foram tratados com BHC (11,25%), DDT (12,5%), CANFENO CLORADO (12,5%), 2,4 DINITRO-O-FENOL (10%), ENXOFRE, TANINO, ÓLEO DE CREOSOTO, TINTA M (usualmente utilizada para a proteção dos cascos das embarcações e fornecida pelo Instituto de Pesca) e TINTA B (tinta branca, comum, para madeira) (tabs. 1 e 2).

Uma série desses tacos, assim tratados, foi pintada com a TINTA B e outra parte utilizada sem a adição de qualquer outro produto além daqueles acima mencionados e em seguida fixados, ao acaso, em 5 armações de ferro, representantes das 5 repetições e submersos no mar por 7 meses e 10 dias (estampa 1).

A ausência de infestação em algumas das 5 repartições não nos permitiu analisar os dados estatisticamente e chegar a uma conclusão segura quanto ao efeito dos diversos tratamentos, principal-

mente em relação a *M. striata*, que além dêsse fato, teve os sintomas, do seu ataque mascarados nos tacos fortemente infestados pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp. Todavia, com relação a estas duas brocas, não obstante a irregularidade de suas infestações, os resultados apresentaram-se bastante indicativos pelo menos em 2 dos 4 ensaios (figs. 1 e 2). A total destruição ocorrida nas TESTEMUNHAS e nos tacos tratados com BHC, DDT, TANINO e ENXOFRE, das 5 repetições, nos leva a acreditar que a irregularidade dessa infestação nos demais tratamentos, não foi uma simples decorrência de uma pequena ou mal distribuída população do *Teredo* sp e *Bankia* sp no campo do ensaio, mas devido a ação dos próprios tratamentos. Admitindo esta hipótese e analisando as figs. 1 e 2, verificamos o seguinte:

— no ensaio relativo a *Influência dos Inseticidas e das Tintas* (tacos rosado tratados com inseticida, tinta B e tinta M — figura 1), sobressairam-se os tratamentos 2.4 DINITRO-O-FENOL (B1), TINTA B (J1), ÓLEO DE CREOSOTO (H1) e o CANFENO CLORADO (A1), sendo que o BHC (C1), o TANINO (F1) e o ENXOFRE (G1), foram totalmente nulos, funcionando como a TESTEMUNHA (I1).

— no ensaio relativo a *Influência dos Inseticidas e da Tinta B* (tacos rosado tratados com inseticida e inseticida + tinta B — figura 2), os tratamentos BHC (C1), TANINO (F1) e ENXOFRE (G1), quando aplicados sem a tinta B, não tiveram qualquer ação protetora, funcionando como a TESTEMUNHA (I1). A adição da tinta B aumentou a eficiência do BHC (C2), CLORDANE (D2), DDT (E2), TANINO (F2) e do ENXOFRE (G2), sem contudo superar a eficiência da TINTA B (I2), o que parece indicar que êsses inseticidas prejudicaram, com excessão do CLORDANE (D2), a ação dessa tinta. Os demais inseticidas, 2.4. DINITRO-O-FENOL (B1 e B2), CANFENO CLORADO (A1 e A2) e o ÓLEO DE CREOSOTO (H1 e H2) situaram-se praticamente num mesmo plano de eficiência independentemente da adição da Tinta B, com a qual ou para a qual, parece não ter havido qualquer incompatibilidade.

Quanto aos outros dois ensaios relativos a qualidade da madeira em relação aos inseticidas e as tintas (figs. 3 e 4), não nos foi possível um julgamento da influência de qualquer um daqueles fatores.

Em relação a *M. striata*, figuras 5, 6, 7 e 8 verificamos a sua maior incidência nos tacos tratados com DDT e BHC (figs. 5, 6 e 7) sem contudo podermos apreciar a eficiência dos diversos tratamentos, quer pela ausência de sua infestação em algumas repetições,

quer pela mascaração do seu ataque, ocasionada pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp.

E' possível que o período de 7 meses e 10 dias de submersão e de exposição dos tacos ao ataque do *Teredo* sp, *Bankia* sp e *M. striata*, tenha sido curto para nos permitir um julgamento do efeito dos inseticidas que mostraram-se aparentemente mais eficientes no controle dessas brocas, principalmente quando em comparação com a TINTA M e o ÓLEO DE CREOSOTO que representam os produtos mais usuais no nosso meio. Diante desta situação, outros ensaios tornam-se necessários para o esclarecimento de vários pontos não devidamente solucionados no presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Consignamos os nossos agradecimentos ao Dr. J. Ribeiro de Moraes, Diretor do Instituto de Pesca Marítima da cidade de Santos, pelo fornecimento dos tacos de madeira, armações de ferro, tinta M e seu irrestrito apoio à realização deste ensaio; à Seção de Identificação e Preservação de Madeiras do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo pela classificação dos tacos utilizados neste ensaio; às firmas Duperial S. A. pela concessão do Gamexane S. G. 940 (90% de isômero gama); Monsanto Chemical Company pela concessão do DDT (100%); Kingler S. A. pela concessão do Clordane (emulsão 74%) e à Preservação de Madeiras S. A. pela concessão do óleo de Creosoto; aos auxiliares B. Luz Ribeiro e W. Finotto pelo auxílio prestado na instalação, inspeções e coleta dos dados experimentais.

ATTACK OF THE MARINE BORERS, TEREDO SP, BANKIA SP AND MARTESIA STRIATA LINNE IN PINE-WOOD BOARDS TREATED WITH INSECTICIDES

A b s t r a c t

In this paper are reported the results of experiments with several insecticides and other chemicals, to control Teredo sp, Bankia sp and Martesia striata Linne, the most important marine borers of our seashores, and quite a serious problem to wood ship hull's conservation, and all other timber submersed in the sea.

Hundred and fifty, 25 x 10 x 2,5 centimeters pine-wood boards, taken from the "hardest" and "alburnum" of Araucaria angustifolia (BERT) O. KUNTZE, that we named "rosy" and "white" respectively, were treated with BHC (11,25%), DDT (12,5%),

CHLORINATE CAMPHENE (12,5%), 2.4. DINITRO-O-PHENOL (10%), SULFUR, TANNIN, CREOSOTE OIL and PAINTS (tab. 2) were tied at random on 5 frame-work (print 1), and kept under sea water for 7 months and 10 days.

The absence of damage caused by marine borers in some replications, made it impossible to conclude on the protective value of the several treatments specially regarding *M. striata*, whose signs were masked in those pine-wood boards intensely injured by *Teredo* and *Bankia*. However, the results brought some understanding in 2 of the 4 experiments, in spite of the heterogeneous attack. The complete destruction of pinewood boards treated with BHC, DDT, TANNIN, SULFUR and CONTROL in the 5 replications, make us infer that those treatments are inefficient, rather than due to small or irregular *Teredo* and *Bankia* populations (figs. 1 e 2 and print 2 A).

It is possible, that the pine wood boards submergence time was not enough to permit a conclusion of the efficiency of the treatments when compared with M PAINT and CREOSOTE OIL, that are the chemicals commonly used here against marine borers. So, further experiments are necessary to clear up some doubtful points of this research.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDRADE, E. NAVARRO — 1911 — Manual do Plantador do Eucaliptos: 100-114.
- 2 — HORN, E. F. — 1948 — *Teredo* Resistant Timber of the Amazon Valley. *Tropical Woods* (93): 35-40.
- 3 — MORRIS, PERCY, A. — 1951 — A Field Guide to the Shells of our Atlantic and Gulf Coasts. Roger Tory Peterson's Field Guide Series.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

ESTAMPA 1

- Fig. A — Armações de ferro utilizadas para a fixação dos 150 tacos de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze (Fot. Finotto).
- Fig. B — Retirada das armações de ferro do mar para exame do estado de conservação dos tacos e de sua fixação nos respectivos varões (Fot. Finotto)

ESTAMPA 2

- Fig. A — Estado de uma das 5 testemunhas (Fot. Vicente)
- Fig. B — Parte externa de um taco tratado, pouco atacado pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp, após 7 meses e 10 dias de submersão no mar (Fot. Vicente)
- Fig. C — Parte interna do mesmo taco mostrado em B (Fot. Vicente)

ESTAMPA 3

Cristalização do DDT na superfície do taco após 7 meses e 10 dias de submersão no mar e posterior secagem em estufa (Fot. Federman, X 6).

ESTAMPA 4

Fig. A — Parte externa de um taco atacado pelo *Teredo* sp, *Bankia* sp e *Martesia striata*. (Fot. Vicente)

Figs. B e C — Parte interna do mesmo taco mostrado em A, revelando as galerias do *Teredo* sp e *Bankia* sp e os orifícios, de forma cônica, característicos da *M. striata*.

ESTAMPA 5

Fig. D — Parte externa de um taco fortemente atacado pelo *Teredo* sp e *Bankia* sp.

Figs. E e F — Parte interna do mesmo taco mostrado em D. Note-se o contraste dos estragos existentes na parte externa e interna e a impossibilidade de se diagnosticar os orifícios da *M. striata*.

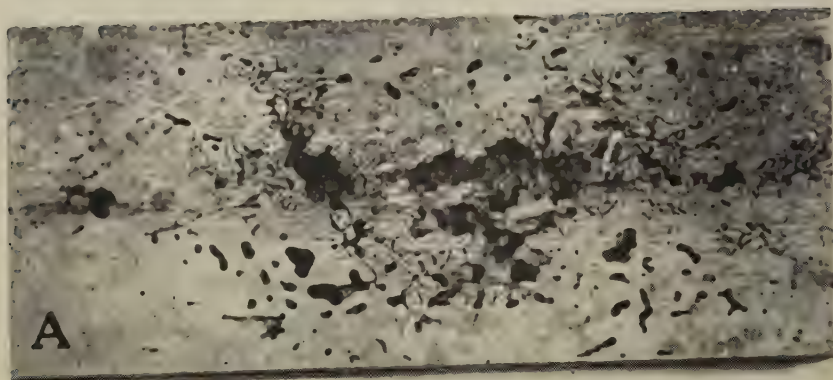




A

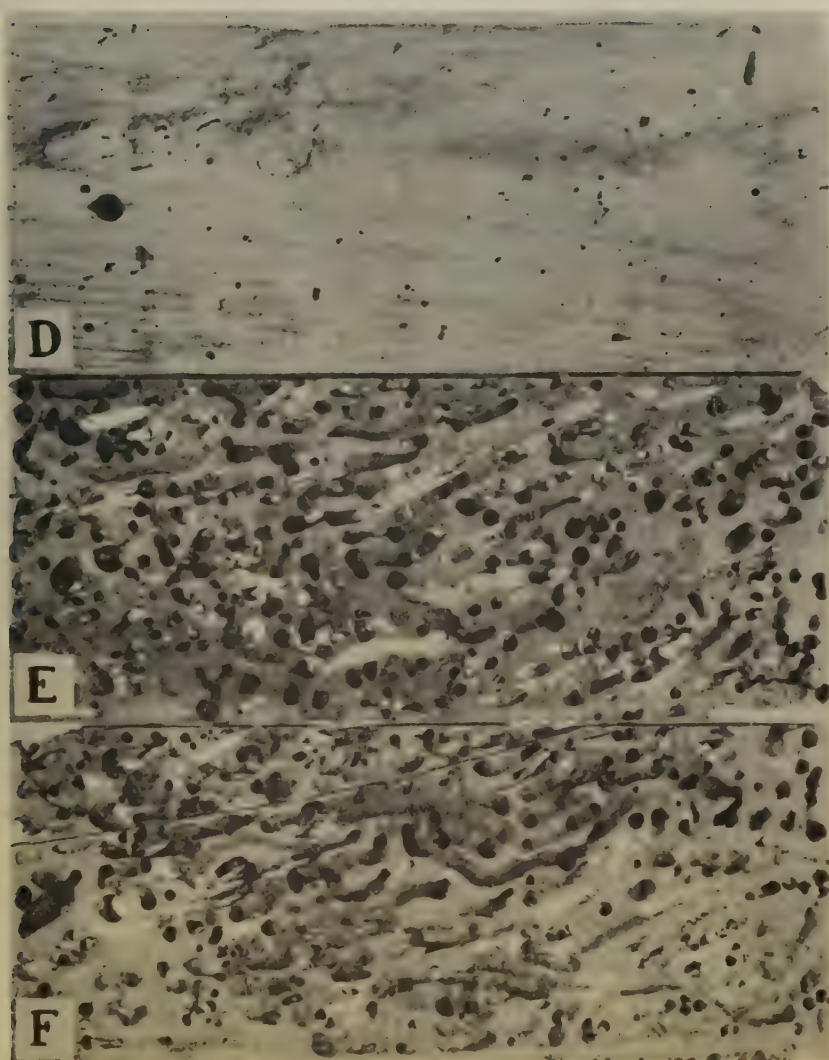


B









EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BHC SÔBRE O BICHO MINEIRO “PERILEUCOPTERA COFFEELLA (GUÉRIN-MÉNEVILLE)”

POR

S. Franco do Amaral

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 4 figuras no texto e estampas 6 a 9

Não obstante as consequências econômicas do ataque do “bicho mineiro” ao cafeeiro, encontrar-se no campo das hipóteses e a vantagem do seu combate pelo BHC, também não estar devidamente comprovada, generalizou-se, entre a maioria dos cafeicultores, a crença de tratar-se de uma séria praga e da necessidade daquele combate químico ser sistematicamente realizado, independentemente do grau de infestação desse inseto e das condições peculiares de cada lavoura.

Em trabalho há pouco publicado (1), chamamos a atenção dos cafeicultores para vários pontos desse problema e para as aplicações do BHC, que injustificadamente, contrariavam as recomendações técnicas aconselháveis para as questões dessa natureza, ainda não devidamente esclarecida.

A persistência dessa situação, que confere ao “bicho mineiro” a posição de principal problema fitossanitário da cafeicultura hodierna, não só pelas questões técnicas que o envolvem, como pela atenção que lhe tem sido dispensada pelos cafeicultores, quantidade de inseticida gasta no seu combate e despesas acarretadas à lavoura de café, indicou-nos a oportunidade deste trabalho, para melhor orientação dos cafeicultores que, de acordo com suas observações, convicções e condições de suas lavouras, julgam necessário e indispensável o combate do “bicho mineiro” pelo BHC.

Os resultados agora obtidos, vêm demonstrar, que a concentração de 1% de isômero gama já está bem acima da necessária para ocasionar a morte das mariposas que representam o “bicho mineiro” no estado adulto e que concentrações mais elevadas, como vêm sendo aplicadas, constituem, por conseguinte, um desperdício e um erro técnico injustificável pelas despesas que ocasionam aos lavradores.

Si levarmos em conta que nêstes últimos dois anos (1953-54 e 1954-55), a broca do café, *Hypothenemus hampei* (FERR. 1867), esteve praticamente ausente e a quantidade de BHC, para o combate dessa praga e do “bicho mineiro”, vendida pelas diversas firmas comerciais, que naquele período atingiu a 15.175 toneladas (5 e 6), não incidiremos em erro se afirmarmos que essa quantidade de inseticida se destinou ao combate do “bicho mineiro”, que assim custou à lavoura de café do Estado de São Paulo, sòmente naqueles dois anos, cêrca de Cr.\$ 95.282.700,00, dos quais Cr.\$ 11.820.200,00 representam o onus resultante da diferença de preço entre o BHC a 1% e as concentrações mais elevadas, utilizadas no combate dêsse inseto (tab. 6).

MATERIAL E MÉTODO

Êste ensáio foi instalado em 24-8-55, no município de Ribeirão Preto, com o objetivo de verificar o efeito de diferentes concentrações do BHC sôbre o “bicho mineiro”, quando utilizadas sob a forma de polvilhamento, que constitue a prática usual para o combate dêsse inseto no estado adulto.

As plantas destinadas aos polvilhamentos com BHC, nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% de isômero gama, bem como as testemunhas, tratadas apenas com talco, foram dispostas ao acaso em 5 repetições, que compreenderam entre si e em todas as direções, uma bordadura de 2 plantas (fig. 1).

Antes do polvilhamento das plantas, realizado às 17 horas, com máquina manual, foram colocados, rente ao solo, sob a saia dos cafeeiros, panos de coloração preta, de modo a formarem, com seus bordos voltados para cima, em angulo reto, verdadeiras caixas, que medindo 3,80 x 3,80 x 0,30 m, estenderam-se a 1 metro além da projeção da copa dos cafeeiros (estampas 6, 7 e 9).

Após o polvilhamento das plantas realizamos duas contagens das mariposas mortas encontradas sôbre os panos de cada planta. A primeira foi feita às 7 horas do dia seguinte ao polvilhamento e a segunda às 15 horas dêsse mesmo dia. (estampa 8). Para a contagem das mariposas, adotamos a técnica de esmagá-las contra o pano, mediante a raspagem do dedo com certa pressão.

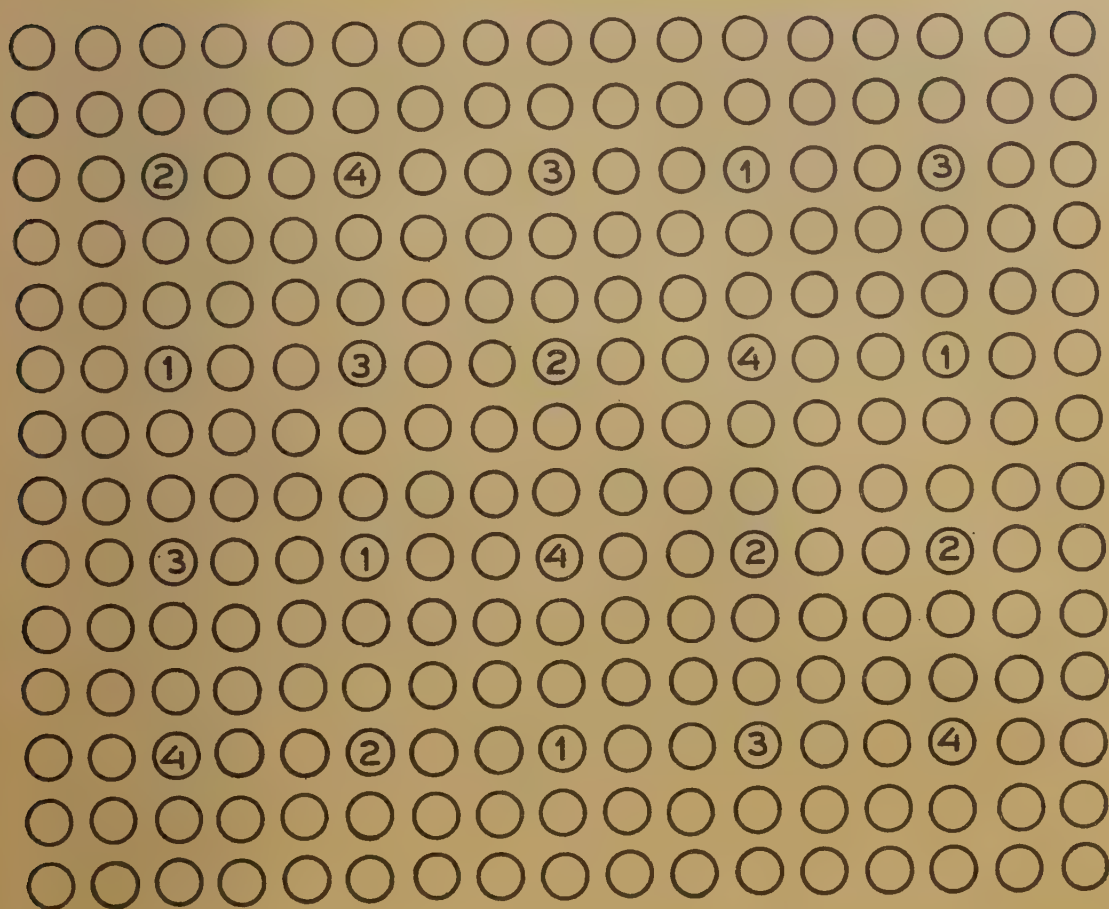


FIG. 1 DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS NO CAMPO

○ = CAFEEIRO
 1 = BHC A 0,5%
 2 = BHC A 1%
 3 = BHC A 1,5%
 4 = TALCO (TESTEMUNHA)

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Os dados experimentais (tab. 1), obtidos por essa técnica nos revelaram, após sua transformação em raiz quadrada e análise pelo método de variância, resultados altamente significativos para os tratamentos, independentemente do período considerado para verificar a ação dos diferentes tratamentos (tabs. 2, 3 e 4).

Os três tratamentos com BHC a 0,5%, 1% e 1,5% de isômero gama, apresentaram todavia, quando analisados pelo método de SCHEFFÉ (2), resultados que variaram de acôrdo com o período de tempo considerado para o exame de seus respectivos efeitos. Para

os períodos de 14 a 22 horas (figs. 2 e 3), aquelas três concentrações mostraram-se altamente significativas quando comparadas com as testemunhas, sem contudo, revelarem diferenças significativas entre si, o que demonstra que elas agiram igualmente e que as diferenças quanto ao número de mariposas mortas, existentes entre essas três concentrações, se devem ao puro acaso e não propriamente a ação dessas diferentes dosagens.

Para o período das últimas 8 horas (fig. 4), a concentração de 0,5% foi a mais eficiente. A de 1% foi significativa apenas em relação a testemunha sendo a de 1,5% praticamente nula, funcionando como a testemunha.

TABELA 1

Mortalidade de mariposas do "bicho mineiro" ocasionada pelos diferentes tratamentos nas 5 repetições

Tratamentos	MORTALIDADE		
	em 14 hs.	nas últimas 8 hs.	em 22 hs.
BHC a 0,5%	996	107	1.103
BHC a 1%	968	87	1.055
BHC a 1,5%	719	47	766
Talco	104	25	129

TABELA 2

Análise de variância da raiz quadrada do número de mariposas mortas 14 hs após os tratamentos

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Variância	F
Total	401,3243	19	21,1234	20,50 ** 2,42
Tratamentos	296,7931	3	98,9310	
Repetições	46,6261	4	11,6565	
Erro	57,9051	12	4,8254	

(**) Altamente significativo, nível fiducial de 1%.

TABELA 3

Análise de variância da raiz quadrada do número de mariposas mortas 22 hs após os tratamentos

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F
Total	391,4419	19	20,6022	23,05 ** 2,44
Tratamentos	297,7056	3	99,2352	
Repetições	42,0884	4	10,5221	
Erro	51,6479	12	4,3039	

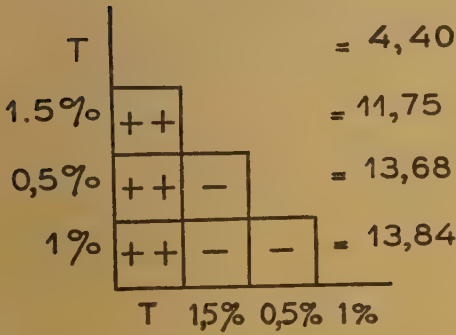
(**) Altamente significativo, nível fiducial de 1%.

TABELA 4

Análise de variância da raiz quadrada do número de mariposas mortas nas últimas 8 horas

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F
Total	26,1738	19	1,3776	
Tratamentos	16,5752	3	5,5251	8,66 **
Repetições	1,9470	4	0,4867	0,76
Erro	7,6516	12	0,6376	

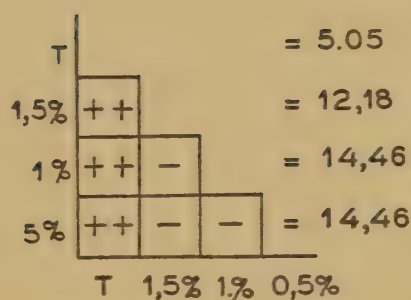
(**) Altamente significativo, nível fiducial de 1%.



INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA DIFERENÇA DAS MÉDIAS $\left\{ \begin{array}{l} 95\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 4,49 \\ 99\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 5,86 \end{array} \right.$

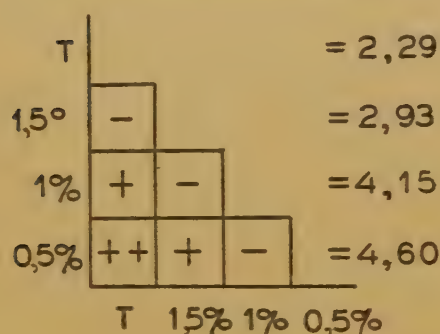
FIGURA-2 REPRESENTAÇÃO GRAFICA DA SIGNIFICAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DIFERENÇAS ENTRE O EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O “BICHO MINEIRO” APÓS 14 HS.

Este gráfico, assim como os demais semelhantes a este, foi construído dispondo-se os diversos tratamentos na vertical esquerda, em ordem crescente de cima para baixo de acordo com os seus resultados que acham-se à direita do gráfico e na horizontal, em ordem crescente da esquerda para a direita, de acordo com aqueles mesmos resultados. Obtém-se o grau de significação estatística entre dois tratamentos da seguinte maneira: na vertical esquerda, procura-se o tratamento correspondente ao maior resultado e segue-se da esquerda para a direita até encontrar-se o quadro do outro tratamento em comparação, que acha-se na horizontal. O sinal (++) indica diferença significativa no nível fiducial de 1% (altamente significativa); o sinal (+) diferença significativa no nível fiducial de 5% (apenas significativa) e o sinal (-) ausência de diferença significativa.



INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA DIFERENÇA DAS MÉDIAS. $\left\{ \begin{array}{l} 95\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 4,24 \\ 99\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 5,54 \end{array} \right.$

FIGURA -3 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA SIGNIFICAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DIFERENÇAS ENTRE O EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O "BICHO MINEIRO" APÓS 22 HS.



INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA DIFERENÇA DAS MÉDIAS. $\left\{ \begin{array}{l} 95\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 1,63 \\ 99\% = \bar{y}_i - \bar{y}_j \pm 2,13 \end{array} \right.$

FIGURA -4 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA SIGNIFICAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DIFERENÇAS ENTRE O EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE O "BICHO MINEIRO" NAS ÚLTIMAS 8 HORAS.

CONCLUSÕES

Os resultados dêste trabalho nos permitem concluir, portanto, que a toxicidade do BHC a 0,5%, 1% ou a 1,5% de isômero gama, foi absolutamente igual para o "bicho mineiro", quando decorridas 14 ou 22 horas de sua aplicação. Esse fato vem demonstrar, por

consequente, que aquela mais fraca concentração já está acima da dosagem letal mínima para o “bicho mineiro” no estado adulto e que o emprêgo de BHC, para o combate dêsse inseto, em dosagem superior a 1%, que está bem acima da necessária para ocasionar a sua morte, constitue um desperdício e um erro técnico injustificável pelas despesas que acarreta ao lavrador (tab. 5).

A maior mortalidade ocasionada pelo BHC a 0,5%, principalmente no período das últimas 8 horas, se deve, certamente, a possível ação repelente dêsse produto que, nessa ocasião em que as mariposas do “bicho mineiro” encontravam-se em maior atividade, acentuou-se nas maiores concentrações, impedindo dêsse modo que maior número dêsse inseto pousasse nos cafeeiros mais fortemente tratados.

TABELA 5

Preço médio do BHC e diferença de preço de 2 polvilhamentos com diferentes concentrações e quantidades para o tratamento de 1.000 cafeeiros

Preço em Cr.\$ (*) do quilo de BHC a				Diferença de preço em Cr.\$					
				Entre 84 quilos a 1% e 84 quilos a			Entre 90 quilos a 1% e 84 quilos a		
1%	1,5%	2%	2,5%	1,5%	2%	2,5%	1,5%	1,5%	2,5%
5,50	6,35	7,30	8,30	71,40	151,20	235,20	38,40	118,20	202,20

(*) — calculado em relação ao preço de 3 firmas comerciais.

DISCUSSÃO

A ausência do efeito repelente do BHC, depois de decorridas 14 e 22 horas de sua aplicação (figs. 2 e 3), se deve, naturalmente, ao fato do polvilhamento ter sido realizado às 17 horas, próximo ao fim do dia e ao pequeno número de indivíduos mortos nas últimas 8 horas, que somados àqueles das 14 horas, perfizeram a mortalidade total ocorrida nas 22 horas. Na ocasião da aplicação dos tratamentos, as mariposas que haviam cessado sua atividade e encontravam-se pousadas nos cafeeiros, apenas afastaram-se das plantas para voltar novamente às mesmas, na sua quasi totalidade, tão logo terminou a aplicação dos diferentes tratamentos. Nestas condições, as mariposas mortas nas primeiras 14 horas, devem representar a população do “bicho mineiro” no estado adulto existente por cafeeiro naquele campo experimental e o efeito das diferentes concentrações do BHC, sem interferência da sua ação repelente, como ocorreu, certamente, no período das últimas 8 horas, compreendido entre às 7

e 15 horas do dia imediato à sua aplicação, quando as mariposas do “bicho mineiro” encontravam-se em franca atividade. Êsse pequeno número de indivíduos mortos nessa ocasião, não foi, todavia, quando somado àqueles das 14 horas, suficiente para modificar o efeito do BHC relativo ao período das 22 horas.

O efeito repelente do BHC, já admitido sôbre a broca do café, por LEPAGE e GIANNOTTI (4), parece se estender assim, também ao “bicho mineiro” quando no estado adulto.

A dosagem de 1%, que já constitue um excesso, é todavia, perfeitamente tolerável por não encarecer excessivamente o combate dêsse inseto e ser a indicada para o contrôle da broca *Hypothenemus hampei* (FERR. 1867) (7). Um inseticida nestas condições, eficiente à mais de uma praga, cujos combates são realizados em épocas diferentes, pode apresentar ainda, a vantagem de eliminar o armazenamento do produto em questão por um período mais prolongado, como poderia ser imposto no caso de dois produtos de diferente especificidade e ocorrência de uma das pragas apenas.

A utilização de BHC com mais de 1% de isômero gama, como vem sendo empregado pela grande maioria dos cafeicultores, sob a justificativa de maiores concentrações corrigirem erros de aplicação, constitue uma idéia falha que não corresponde a realidade, dadas as particularidades do BHC, os fatôres que podem concorrer para os erros de aplicação e os hábitos do “bicho mineiro” no estado adulto, que é a fase suscetível a ação dêsse inseticida.

O BHC é um inseticida que não pertence ao grupo dos produtos excessivamente voláteis. Apesar de se tratar de um inseticida de tripla ação, isto é, que age por contato, ingestão e repelência, o seu efeito no campo, sôbre as pragas do café, para as quais é indicado, se faz sentir principalmente quando há um contato direto do inseto com o inseticida.

Os erros de aplicação estão condicionados, em geral, aos seguintes fatôres:

- utilização de produtos com dosagem inferior a necessária para ocasionar a morte do parasita que se deseja combater.
- emprêgo de produtos em quantidade menor do que a necessária para proteger suficientemente um determinado número de plantas.
- aplicação de tratamentos em época não apropriada pela inexistência do parasita ou estragos por êle já ocasionados.
- má distribuição do produto na lavoura por deficiência mecânica do aparelho ou falta de habilidade do seu operador.

Analisando esta última hipótese, na qual parece assentar-se a idéia da vantagem do emprêgo de BHC em concentrações superiores a 1%, uma vez que aquelas três causas restantes não poderiam ser assim corrigidas e levando em conta o modo de ação do BHC sobre a “broca” e o “bicho mineiro” bem como a impossibilidade prática, de tornar-se o ar, toxico à êsses insetos pela volatilização dêsse inseticida, como pode correr em ambiente confinado, verificamos que êsse aumento de concentração constitue uma medida incapaz de corrigir tal ou tais erros de aplicação. A má distribuição de um inseticida de contato desta natureza, por maior que seja a sua concentração, implicará portanto, na proteção parcial das plantas, que assim, terão partes suscetíveis ao ataque dos parasitas.

Êsse erro de aplicação, responsável pelo insucesso no combate aos parasitas e muito especialmente daqueles que permanecem, como a broca, pouco tempo em contato com as partes da planta atingíveis pelo inseticida ou como as “cochonilhas” que, em geral, se locomovem apenas na forma jovem, no caso do “bicho mineiro” si bem que de grande valor, decresce todavia de importância, dado os hábitos dos adultos dêsse inseto. As mariposas do “bicho mineiro” que vivem no ambiente externo, frequentemente esvoaçando o cafeeiro, estão constantemente mudando de pouso, com maior probabilidade de entrar em contato com o inseticida e diminuir assim, as consequências dêsse erro de aplicação.

Considerando entretanto, que êsse erro de aplicação, quando muito acentuado, diminuirá sem dúvida a eficiência do tratamento para o contrôle do “bicho mineiro” e que a sua correção só será conseguida com a eliminação da sua causa, que reside na má distribuição do inseticida e não pròpriamente na deficiência da sua concentração, será mais aconselhável, ao em vez de se usar BHC com 1,5%, 2% ou mesmo 2,5% como tem acontecido, aumentar a sua quantidade de 40-42 quilos, já considerada suficiente para proteger cêrca de 1.000 cafeeiros (8), para 45 quilos. Êsse aumento, além de ser mais econômico, poderá compensar mais facilmente a deficiência do operador ou da polvilhadeira e assim, permitir um melhor envolvimento das plantas pelo inseticida. (tab. 5)

O admitido efeito repelente do BHC sobre o “bicho mineiro”, não deve servir de motivo para sua utilização em concentrações superiores a 1%, pois êsse inseticida, quando aplicado às plantas e exposto a ação dos ventos e dos raios solares, como soe acontecer nas condições de campo, perde o seu efeito dentro de poucos dias (3). Nessas condições, a proteção de uma lavoura baseada no efeito repe-

lente do inseticida, seria possível somente quando se tratasse de um produto estável, de longo período de duração. No caso do BHC, quando nas condições acima apontadas, ainda que possível, tal proteção seria antieconômica, dado o elevado número de tratamentos que seria exigido para, desse modo, ser evitado o ataque do “bicho mineiro” num período razoavelmente longo ou satisfatório.

TABELA 6

Quantidade de BHC consumida pela lavoura de café do Estado de São Paulo, nos períodos de 1953-54 e 1954-55

Conc.	Período 1953-54		Período 1954-55		Total nos 2 períodos	
	Toneladas	Valor em Cr.\$	Toneladas	Valor em Cr.\$	Toneladas	Valor em Cr.\$
1%	4.106	22.583.000,00	90	495.000,00	4.196	23.078.000,00
1,5%	5.430	34.480.500,00	2.930	18.605.500,00	8.360	53.086.000,00
2%	986	7.197.800,00	1.633	11.920.900,00	2.619	19.118.700,00
Total ..	10.522	64.261.300,00	4.653	31.021.400,00	15.175	95.282.700,00

SUMÁRIO

Este trabalho teve por objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações do BHC, sobre o “bicho mineiro”, quando aplicadas sob a forma de polvilhamento, que constitui a prática usual para o combate desse inseto no estado adulto.

As plantas destinadas ao polvilhamento com BHC, nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% de isômero gama, bem como as testemunhas tratadas apenas com talco, foram dispostas ao acaso em 5 repetições (fig. 1).

Antes do polvilhamento das plantas, realizado às 17 horas com máquina manual, foram colocados, rente ao solo, sob a saia dos cafeeiros, panos de coloração preta, de modo a formarem verdadeiras caixas destinadas a coleta das mariposas mortas pela ação dos diferentes tratamentos (estampas 6 e 7).

Após o polvilhamento das plantas realizamos duas contagens das mariposas mortas encontradas sobre o pano de cada planta. A primeira foi feita às 7 horas do dia seguinte ao polvilhamento e a segunda às 15 horas desse mesmo dia (tab. 1). Para a contagem das mariposas, adotamos a técnica de esmagá-las contra o pano, mediante a raspagem do dedo com certa pressão. (estampa 8).

Os dados experimentais, obtidos por essa técnica, nos revelaram, após sua transformação em raiz quadrada e análise pelo

método de variância, resultados altamente significativos para os tratamentos, independentemente do período considerado para verificar a ação dos diferentes tratamentos (tabs. 2, 3 e 4).

Os três tratamentos com BHC a 0,5%, 1% e 1,5% de isômero gama, apresentaram todavia, quando analisados pelo método de SCHEFFÉ (2), resultados que variaram de acordo com o período de tempo considerado para o exame de seus respectivos efeitos. Para os períodos de 14 e 22 horas (figs. 2 e 3), aquelas três concentrações mostraram-se altamente significativas quando comparadas com as testemunhas, sem contudo revelarem diferenças significativas entre si, o que demonstra que elas agiram igualmente e que as diferenças quanto ao número de mariposas mortas, existentes entre essas três concentrações, foram obras do acaso e não propriamente devido a ação dessas diferentes dosagens.

Para o período das últimas 8 horas (fig. 4), a concentração de 0,5% foi a mais eficiente. A de 1% foi significativa apenas em relação a testemunha sendo a de 1,5% praticamente nula, funcionando como a testemunha.

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir, portanto, que a toxicidade do BHC a 0,5%, 1% ou 1,5% de isômero gama, foi absolutamente igual para o “bicho mineiro”, quando decorridas 14 ou 22 horas de sua aplicação. Esse fato vem demonstrar, por conseguinte, que aquela mais fraca concentração já está acima da dosagem letal mínima para o “bicho mineiro” no estado adulto e que o emprego de BHC, para o combate desse inseto, em dosagem superior a 1%, que está bem acima da necessária para ocasionar a sua morte, constitui um desperdício e um erro técnico injustificável pelas despesas que acarreta ao lavrador.

A maior mortalidade ocasionada pelo BHC a 0,5%, principalmente no período das últimas 8 horas (tab. 1 e fig. 4), pode ser explicada pela sua possível ação repelente, que certamente se acentuou nessa ocasião, quando as mariposas do “bicho mineiro” estavam em franca atividade.

AGRADECIMENTOS

Consignamos os nossos agradecimentos ao Senhor Alcino Ribeiro Meirelles pela permissão deste trabalho na sua propriedade, fazenda Santo Antonio e facilidades proporcionadas; à Seção de Química deste Departamento, pela análise das diferentes concentrações do BHC por nós preparadas e aos auxiliares B. Luz Ribeiro e W. Finotto, pelas sugestões, confecção dos panos para coleta das

mariposas e demais auxílios prestados na instalação e andamento dêste trabalho, bem como ao auxiliar O. Mattos Robalinho, pela ajuda na contagem das mariposas mortas pelos diferentes tratamentos.

EFFECT OF DIFFERENTS BHC CONCENTRATIONS ON THE BICHO MINEIRO "*PERILEUCOPTERA COFFEELLA* (GUÉRIN-MÉNEVILLE)"

A b s t r a c t

*In this paper are reported the results of experiments with BHC to control *Perileucoptera coffeella* (bicho mineiro).*

The dusting of the trees with BHC at 0,5%, 1%, and 1,5% (gama is.) and talc were arranged at random and replicated five times (fig. 1).

The dead moths were collected on black clothes that were previoulsy set on the soil (prints 6 and 7) and their number counted 14 and 22 hours after the dusting (tab. 1)

The results of the 3 treatments, either after 14 or 22 hours, were highly significant when compared to the check (figs. 2 and 3). However there were no significant differences among them.

The BHC at 0,5% was as efficient as at 1% or 1,5%. It is interesting to note however, that the mortality during the last 8 hours (difference between the two counts) was significantly higher for the BHC at 0,5%. This perhaps was due the higher repelent action of the more concentrated treatments (tab. 1 and fig. 4).

By the results we conclude that 0,5% (gama is.) is a dose enough high for the control "bicho mineiro" moths and that all BHC dusting with more than 1% is a waste.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — AMARAL, S. FRANCO DO — 1953 — Considerações Sôbre o Bicho Mineiro e Sua Importância Econômica. *O Biológico*, São Paulo, 19 (5): 85-92.
- 2 — GOMES, F. P. — 1954 — A Comparação Entre as Médias de Tratamentos na Análise de Variância. *An. E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, U. S. P. 11: 1-12.
- 3 — LEPAGE, H. S. e O. GIANNOTTI — 1945 — Técnica para ensaio de inseticidas residuais. *O Biológico*, São Paulo, 11 (12): 320-325.
- 4 — LEPAGE, H. S. e O. GIANNOTTI — 1949-50 — Atividade de Alguns Inseticidas Modernos sôbre a Broca do Café "*Hypothenemus hampei* (FERRARI)". *Arg. Inst. Biol.* São Paulo, 19: 299-308.
- 5 — LEPAGE, H. S. e S. GONÇALVES DA SILVA — 1954 — Consumo de Inseticida no Estado de São Paulo no Ano Agrícola 1953-54. *O Biológico*, São Paulo, 20 (10): 170-173.

- 6 — LEPAGE, H. S. e S. GONÇALVES DA SILVA — 1955 — Consumo de Inseticida no Estado de São Paulo no Ano Agrícola 1954-55. *O Biológico*, São Paulo, 21 (7): 122-126.
- 7 — SEIXAS, C. A. — 1948 — A Prática do Combate Químico à Broca do Café. *O Biológico*, São Paulo, 14: (4) 71-89.
- 8 — SEIXAS, C. A. — 1948 — Erros e Falhas no Combate Químico à Broca do Café. *O Biológico*, São Paulo, 14 (10): 225-241.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 6

Cafeeiro com pano preto, em forma de caixa, para coleta das mariposas, do “bicho mineiro”, mortas pelos diferentes tratamentos. (Fot. Finotto).

Estampa 7

Vista parcial das 5 repetições (Fot. Finotto).

Estampa 8

Contagem das mariposas do “bicho mineiro”, encontradas mortas sobre o pano preto. (Fot. Finotto)

Estampa 9

Pano preto mostrando a abertura lateral, necessária para a adaptação e amarração da sua parte central ao tronco do cafeeiro. A abertura lateral, depois da adaptação do pano, foi costurada com alfinetes. (Fot. Vicente)







DOENÇA CRÔNICA RESPIRATÓRIA NO BRASIL (São Paulo)

POR

A. Tello Garust

(Fac. Med. Veterinária, Lima, Peru)

P. Nóbrega

(Instituto Biológico, São Paulo)

Com a estampa 10

Desde 1943, quando foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos por DELAPLANE e STUART (2), a Doença Crônica Respiratória (D. C. R.) constitui um dos principais problemas com que se defrontam as explorações avícolas industriais, especialmente as que se dedicam à produção de frangos para consumo. Na América do Norte esta doença, cuja incidência e severidade tem aumentado nos últimos anos, apresenta considerável importância econômica não só nos Estados Unidos (7,13) mas também no Canadá, onde sua presença tem sido referida com relativa frequência (5). Na América do Sul, seu aparecimento é recente e a sua introdução se fez provavelmente através das contínuas importações de ovos para incubação e pintos de um dia procedentes de granjas situadas em áreas infectadas dos Estados Unidos. Foi assinalada no Uruguai por TRENCHI (12) e referida na Venezuela (11). Até o momento não foi verificada na Argentina (9) e no Chile (1) e, segundo informações de que dispomos, também não ocorre no Peru.

No Brasil, os primeiros casos com sintomatologia suspeita de D. C. R. foram observados em princípios de 1954 (10) em aves recebidas para exame no Instituto Biológico de São Paulo. Estas suspeitas foram parcialmente confirmadas pela reprodução experimental da doença em frangos e por estudos histopatológicos de material dêles procedente.

Ampliando observações anteriores, é objetivo do presente trabalho referir a identificação do agente etiológico, P. P. L. O. (Pleuropneumonia Like Organisms), por isolamento em ovos embrionados e meios especiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Dos casos recebidos pelo nosso laboratório durante o ano de 1955, acompanhados de um quadro sintomático respiratório (secreção nasal, conjuntivite e dispnéia) e que à necrópsia revelavam alterações sugestivas (exsudato traqueal, aerocistite, pneumonia), colhemos a traquéia nas melhores condições possíveis de esterilidade.

O inóculo consistiu sempre em suspensão de exsudato traqueal em água fisiológica adicionado de 4.000 U. de penicilina e 5mg de estreptomicina por cm^3 . Usamos para cada caso 8 ovos embrionados com 6 dias de idade, inoculando-se 0,2 cm^3 da suspensão no saco vitelino. A mortalidade dos embriões era considerada suspeita a partir do 4.^o dia e levada em conta até o momento da eclosão.

As passagens de rotina eram feitas a partir de gêma obtida estérilmente e diluída a 1:5. Esse material era também semeado em caldo de enriquecimento para P. P. L. O. (*) e incubado 4-6 dias a 37°C e daí passado para agar P. P. L. O. (*); as placas eram mantidas em uma atmosfera com 10% de CO_2 durante 4 a 6 dias a 37°C. Entre as duas operações efetuavam-se controles de esterilidade do material.

A reprodução experimental se conseguiu por inoculação de material infectante (exsudato traqueal ou gêma) nos seios orbitários e instilação nasal e traqueal em frangos de 45 dias.

Apenas foram considerados de D. C. R. aqueles casos em que se isolou P. P. L. O. das traquéias das aves examinadas, segundo o conceito de LECCE e SPERLING (8), pois a evidência clínica acompanhada de infecção dos sacos aéreos não é suficiente para estabelecer um diagnóstico (14).

RESULTADOS

A patogenicidade do agente etiológico atingiu 70 a 100% sómente depois de 3 a 4 passagens em ovos embrionados.

Nos embriões mortos a partir da 2.^a ou 3.^a passagens, as lesões foram de congestão em vários graus de intensidade e algumas vezes hemorragias cutâneas; membrana corioalantóide espessada e muitas vezes com áreas de opacidade; saco vitelino congestionado e em geral com hemorragias circunscritas. Um embrião que morreu aos 20 dias de incubação apresentou exsudato caseoso no terço inferior da traquéia, brônquios, pulmão esquerdo e sacos aéreos torácicos. Em nenhum caso observamos a artrite assinalada por DELAPLANE (3).

Os esfregaços preparados com saco vitelino dos embriões mortos, corados pelo método de MACCHIAVELLO, revelaram a presença de corpúsculos elementares no citoplasma celular (estampa 10 fig. 1).

O agente etiológico, quando inoculado no saco alantóico de embriões de 9 a 11 dias, não determinou mortalidade alguma, não se observando assim a presença do vírus descrito por FAHEY e CRAWLEY (6).

(*) O caldo de enriquecimento e o agar P. P. L. O. foram preparados segundo a fórmula do manual Difco (4). Usamos 25% de sêro de cavalo por não dispormos de fração A de sêro bovino.

No caldo de enriquecimento, o P. P. L. O. produziu apenas ligeira opacidade do meio, não havendo pròpriamente turvação perceptível. No agar, o desenvolvimento das colônias típicas de P. P. L. O. foi verificado após 4 a 6 dias de incubação (estampa 10, fig. 2) observando-se maior elevação da sua zona central. Em todos os casos foram necessárias 1 a 4 passagens em ovos para obter crescimento em placas.

Nos frangos inoculados, os primeiros sintomas respiratórios (secreção nasal, espirros e sacudimentos de cabeça) foram notados entre o 6.^o e 12.^o dias após a inoculação. Algumas vezes êstes sintomas se acompanhavam de conjuntivite e tumefação moderada da face. À necrópsia, todos apresentaram exsudato na traquéia. De um total de 18 frangos inoculados, 4 (22,2%) mostraram espessamento dos sacos aéreos acompanhado de abundante depósito de exsudato caseoso, em 13 (72,2%) havia opacidade em grau variável e em 1 (5,5%) os sacos aéreos eram aparentemente normais.

O P. P. L. O. foi sempre reisolado das traquéias das aves inoculadas experimentalmente e sacrificadas.

R E S U M O

Completando observações anteriores, os autores assinalam a presença de Doença Crônica Respiratória no Brasil (São Paulo).

De 30 casos examinados durante o ano de 1955, o P. P. L. O. foi isolado 4 vezes (13,3%). Houve necessidade prévia de 1 a 4 passagens em ovos embrionados para se obter crescimento em meio solido, e 3 a 4 passagens para que a mortalidade dos embriões atingisse 70 a 100%.

Nos frangos inoculados experimentalmente, as lesões eram de aerocistite em 22,2%, opacidade variável dos sacos aéreos em 72,2% e sacos aéreos aparentemente normais em 5,5%.

CHRONIC RESPIRATORY DISEASE IN BRAZIL

A b s t r a c t

Completing former observations, the occurrence of the Chronic Respiratory Disease is demonstrated in Brazil (São Paulo).

From 30 cases which showed symptoms of the disease, examined during 1955, the PPLO were isolated in 4 instances (13.3%). The agent had to be passed from 1 to 4 times through embryonated eggs before growing on solid medium, and from 3 to 4 times to produce an embryonic mortality of 70-100%.

22.2% of the experimentally inoculated chicks showed aerocystitis; 72.2% only showed opacity of variable degree in the air sacs and 5.5% showed apparently normal air sacs.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CORNEJO, M. — 1955 — Comunicação pessoal.
- 2 — DELAPLANE, J. P. and STUART, H. O. — 1943 — The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 4: 325-332.
- 3 — DELAPLANE, J. P. — 1948 — Some recent observations of lesions in chick embryo induced by the virus of chronic respiratory disease of chickens. *Cornell Vet.*, 38: 192-195.
- 4 — Difco Laboratories Inc. — 1953 — Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. Ninth edition, 82, 89, 90.
- 5 — FAHEY, J. E., CRAWLEY, J. F. and DUNLOP, W. R. — 1953 — Studies on Chronic respiratory disease of chickens. Observations on outbreaks in Canada in two year period. *Canad. J. Comp. Med.*, XVII (7): 294-298.
- 6 — FAHEY, J. E. and CRAWLEY, J. F. — 1954 — Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus. *Canad. J. Comp. Med.*, 18: 13-21.
- 7 — JOHNSON, E. P. — 1951 — Now we have air sac colds. *Broiler Growing*, 2: 12-26.
- 8 — LECCE, J. G. and SPERLING, F. G. — 1954 — Chronic respiratory disease. I. The isolation of pleuropneumonia like organisms as a diagnostic aid. *Cornell Vet.*, XLIV: 441-449.
- 9 — PEROTTI, R. — 1955 — Comunicação pessoal.
- 10 — REIS, J., NOBREGA, P. e col. — 1955 — Análise de 17.753 necrópsias realizadas na Seção de Ornitopatologia de 1930-1953. *Arq. Inst. Biológ.*, São Paulo, Vol. 22: 119-160.
- 11 — RUIZ MARTINEZ, C. — *in* Compte rendu de la 23^e session du Com. de l'Off. 1955. *Bul. de l'Off. Int. Epiz.*, XLIV: 489.
- 12 — TRENCHI, H. — 1954 — Enfermedad respiratoria crónica de Delaplane. *Veterinaria*, XII, "2da Epoca" (2), Montevideo.
- 13 — VAN ROEKEL, H. and OLESIUUK, O. M. — 1952 — Chronic respiratory disease of chickens. Proc. Book A. V. M. A. 89th. Ann. Meet. Atlantic City, June 23-26: 271-275.
- 14 — WASSERMAN, B., YATES, V. J. and FRY, D. E. — 1954 — On so-called air sac infection. *Poultry Sc.*, 33 (3): 622-623.

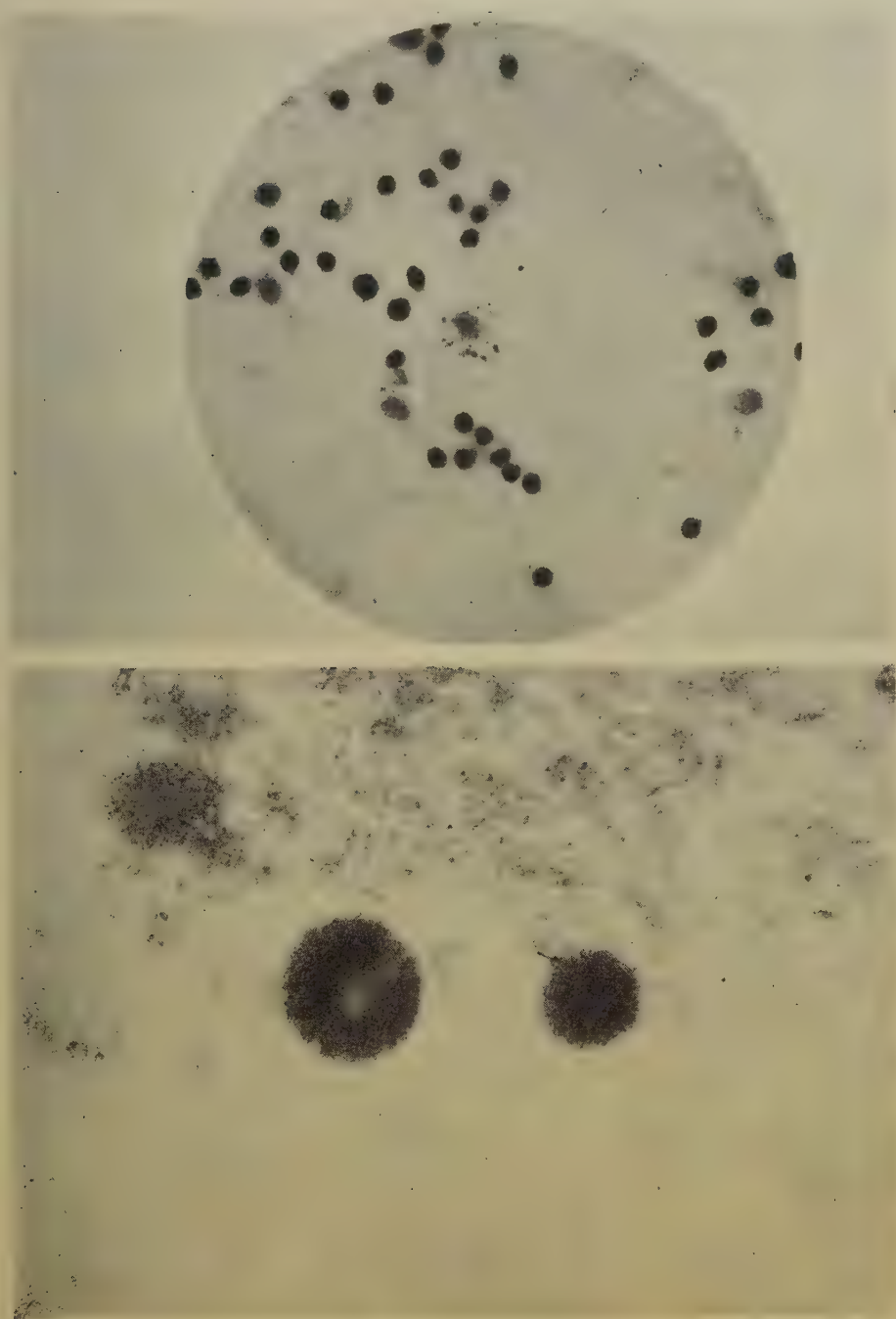
EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 10

Fig. 1 — Célula com corpúsculos elementares de P. P. L. O. (esfregação de saco vitelino). Original, x 500.

Fig. 2 — Colônias de P. P. L. O. em agar. Original, x 85.





SÔBRE A OCORRÊNCIA DE ORNITOSE EM PÁSSAROS

POR

P. Nóbrega, E. E. Trapp e M. Giovannoni

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Segundo a recomendação de MEYER (1942), o termo *ornitose* deve ser reservado às infecções determinadas pelo vírus da psitacose em aves não pertencentes aos psitacideos. Os numerosos relatos sôbre epidemias e isolamentos do vírus de papagaio, periquito, galinha, canário e aves selvagens, apresentam grande interesse em epidemiologia pois infecções humanas, caracterizadas principalmente por uma pneumonia atípica, correm paralelas com tais verificações.

No Brasil, a ornitose foi identificada pela primeira vez em pombos por VALLE (1950) mediante provas sorológicas e isolamento do vírus. NÓBREGA e BUENO no mesmo ano, isolam o vírus da ornitose, do baço de 27% de pombos aparentemente normais.

Tivemos oportunidade de estudar recente foco de ornitose em várias espécies de pássaros conservados em cativeiro em residência particular nesta cidade.

Recebemos para exame dois calafates (*Padda oryzivora*), mortos, apresentando sinais de diarréia e, à necrópsia, fígado e baço aumentados de volume e com necroses puntiformes.

As pesquisas bacteriológicas e protozoológicas foram negativas. Cinco camundongos foram inoculados com suspensão de fígado e baço na dose de 0,2 cm³ por via peritoneal e 0,02 cm³ por via cerebral; 96 horas após morria o primeiro camundongo inoculado no cérebro e em preparações dêsse órgão, feitas por decalque e coradas pelo método de CASTAÑEDA, verificou-se a presença de numerosos corpúsculos L. C. L. Nos dias seguintes isolava-se também o vírus dos demais camundongos.

Diante desses resultados era aconselhável a extinção do foco; 24 pássaros de várias espécies foram sacrificados sendo a mistura de fígado e baço de cada um dêles inoculada em camundongos nas condições acima descritas.

A D1 50 do vírus foi determinada em camundongos por inoculação de suspensão de baço de camundongo positivo para L. C. L.; o vírus foi diluído de 10⁻² a 10⁻⁸ e cada diluição inoculada pelas vias peritoneal (0,2 cm³) e cerebral (0,02 cm³) respectivamente em 5 camundongos. Verificamos que a D1 50 do vírus, determinada pelo

método de REED-MUENCH, é da ordem de 1:400.000 para ambas as vias de inoculação.

No quadro abaixo figuram os pássaros examinados e o número de casos positivos dos quais foi isolado o vírus da ornitose.

N.º de pássaros examinados	ESPÉCIES		L. C. L. positivo
	Nome comum	Nome científico (*)	
6	Calafate	<i>Padda oryzivora</i>	2
3	Galo da campina	<i>Paroaria dominicana</i>	1
1	Tié-sangue	<i>Rhamphocoelus brasiliensis dorsalis</i>	1
2	Saíra azul	<i>Tangara seledon</i>	1
1	Saí	<i>Dacnis cayana paraguayensis</i>	0
1	Pintassilgo	<i>Spinus magelanicus ictericus</i>	0
1	Pintassilgo	<i>Spinus yarrellii</i>	0
2	Coleirinha	<i>Sporophila</i> sp.	1
8	Canário do reino	<i>Fringilla canariensis</i>	2
1	Canário da terra	<i>Sicalis pelzelni</i>	0

ON THE OCCURRENCE OF ORNITHOSIS IN PASSERINES

Abstract

The authors describe an outbreak of ornithosis among several birds kept in captivity and belonging to different species. The virus has been isolated from *Padda oryzivora*, *Paroaria dominicana*, *Rhamphocoelus brasiliensis dorsalis*, *Tangara seledon*, *Sporophila* sp. and *Fringilla canariensis*.

BIBLIOGRAFIA

- MEYER, K. F. — 1942 — *Medicine*, 21: 175.
 NOBREGA, P. e BUENO, R. C. — 1950 — Sobre a incidência do vírus de psitacose em pombos aparentemente normais. *Ciencia e Cultura*, S. Paulo, 4 (2): 303.
 VALLE, L. A. R. — 1950 — Infecções do Grupo da Psitacose em Psitacideos e Colombideos Brasileiros. Isolamento de vírus. V. Congr. Inter. Microb., Rio de Janeiro: 104.

(*) Agradecemos aos Drs. Helio Ferraz de Almeida Camargo e Eurico Alves de Camargo, do Departamento de Zoologia, a determinação das espécies.

ESTUDOS SÔBRE AS MIRIANGIALES

VIII. A ANTRACNOSE MACULADA DA SERINGUEIRA, CAUSADA POR *ELSINOE* ^(1,2)

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins ^(3,4)Do Instituto Biológico de S. Paulo e
da United States International Cooperation Administration

Com as estampas 11 a 14

Tem havido nos últimos anos um grande interesse em São Paulo pela cultura da seringueira. De maior produtor de borracha do mundo, que era no início do século, o Brasil passou para uma categoria inferior, não produzindo hoje, sequer, o suficiente para seu consumo em constante ascensão.

O aparecimento de uma nova doença em plantações desta valiosa Euforbiacea não pode portanto deixar de despertar o interesse dos que vislumbram na sua cultura no território do Estado de São Paulo, a possibilidade do País readquirir importância entre os grandes produtores mundiais. E' bem conhecido que nas Américas diversas doenças da seringueira apresentam importância considerável, sob o ponto de vista econômico, constituindo um fator de insucesso nessa cultura.

O presente trabalho relata os estudos que realizamos a respeito desta nova doença da seringueira cuja importância econômica, atual ou potencial, não estamos ainda em condições de julgar mas que, pelo fato de seu agente pertencer a um grupo de fungos entre

(1) Uma contribuição dentro do programa de Assistência Técnica em operação no Brasil, sob administração conjunta dos Governos do Brasil e dos Estados Unidos. Para os Estados Unidos o programa é administrado pela International Cooperation Administration (ICA), através do Institute of Inter-American Affairs.

(2) Os primeiros resultados dos estudos sobre a antracnose maculada da seringueira foram apresentados na Secção de Fitopatologia do 2.º Congresso Panamericano de Agronomia, em Aguas de São Pedro, São Paulo, 29 de Março a 6 de Abril de 1954, em colaboração com Victoria Rossetti (Bitancourt, Jenkins e Rossetti 1954) e publicados no mesmo ano, com ilustrações (Jenkins, Bitancourt e Rossetti 1954).

(3) Dr. Jenkins, Micologista, está destacada no Technical Assistance Program, no Brasil. Pertencia anteriormente à Plant Disease, Epidemics and Identification Section, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, Estados Unidos.

(4) Com prazer apresentamos aqui os nossos agradecimentos àqueles que contribuíram com alguns dos espécimens sobre os quais é baseado este trabalho, isto é, A. M. Gorenz, J. H. Holz, H. F. Pereira, Victoria Rossetti e R. D. Rands (ver espécimens citados, p 51). Somos igualmente gratos a L. A. Beery Jr., E. P. Imle, M. L. Langford, J. A. Stevenson e F. L. Wellman, pela cooperação que prestaram aos nossos esforços para destrinçar alguns aspectos da história e da distribuição geográfica da presente doença. Também sentimos gratidão ao falecido G. Stahel que há muitos anos (1939) deu ao primeiro autor um excelente espécimen micológico de *Dothidella ulei* citado no texto. Apresentamos também os nossos agradecimentos a Dom B. Pickel que traduziu para o latim a diagnose da nova espécie. Somos especialmente gratos aos curadores de diversos herbários cujos espécimens fanerogâmicos foram examinados pelo segundo autor, conforme vem mencionado p. 52. A esse respeito queremos mencionar em particular a gentileza de R. E. Schultes, curador, Herbário de Oakes Ames, Harvard University, grande coletor de *Hevea* na Amazonia e especialista deste gênero.

os quais se acham alguns dos mais sérios parasitas das plantas cultivadas, julgamos poder, eventualmente, dadas condições favoráveis, se tornar uma grave ameaça à cultura da seringueira.

A DOENÇA

Nome, história e distribuição

Estamos designando a doença por "antracnose maculada" ⁽⁵⁾ da seringueira (*Hevea brasiliensis* MUELL. ARG.).

O nosso espécimen mais antigo desta doença data de Agosto de 1942, época em que o primeiro autor a descobriu numa plantação do Município de Manaus, Amazonas (IB 4444) ⁽⁶⁾ e nos canteiros experimentais do Instituto Agrônômico do Norte, em Belém do Pará (IB 4448). Nos dois casos a doença era pouco conspicua, ao passo que no espécimen de Manaus, a "queima da folha" (*South American leaf blight*), causada por *Dothideella ulei* P. HENN., estava bem em evidência.

A doença em apreço tornou a chamar a nossa atenção em 1948-49, quando foi descoberta na América Central. RANDS, pesquisador da queima da folha (ver RANDS 1924), procurando a temível doença no Centro de Propagação e Pesquisas da Seringueira dos Estados Unidos, em Cuyotenango, Guatemala, descobriu, no seu lugar, a antracnose maculada. A identificação da doença da Guatemala foi feita pelo segundo autor, baseada em espécimens de RANDS (IB 5357, 5359-60) que lhe foram enviados.

A presença da antracnose maculada em outras plantações de seringueira na América Central (ver LANGFORD 1945) é atualmente ignorada, ou, como no caso de Costa Rica, incerta. Em conversa do segundo autor com LANGFORD, assim como com IMLE, colega de LANGFORD (LANGFORD 1945, nota 2), foi possível verificar que o que eles atribuíram a trips ou ácaros em Costa Rica, poderia ser a antracnose maculada.

No Brasil a doença voltou novamente à nossa atenção em 1951 e 1953 quando foi constatada no litoral do Estado de São Paulo, em culturas em quarentena, mantidas sob observação pela Seção de Vigilância Sanitária Vegetal do Instituto Biológico. Esta quarentena tinha, naturalmente, como fim principal, interceptar a possível introdução de *Dothideella ulei* numa nova região de cultura

⁽⁵⁾ Para a origem deste termo e a sugestão de que ele deveria ser reservado para as doenças causadas por *Elasmoid*, como no caso presente, ver Jenkins 1947a.

⁽⁶⁾ Os números entre parênteses, precedidos do prefixo "IB", são os dos espécimens do herário da Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico, relacionados debaixo do título "Especimens examinados", p. 51.

da seringueira. Os técnicos da Vigilância, descobrindo uma doença suspeita das fôlhas na Estação Experimental de Ubatuba (1951) e na Fazenda Rio Claro, de Caraguatatuba (1953), submeteram espécimens (IB 5785, 6118) à Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico, para sua identificação. O material de Caraguatatuba (IB 6118), devido à presença de frutificações do patogeno, embora em pequena quantidade, permitiu a primeira diagnose positiva da nova doença (ver seção "Classificação do patógeno", p. 48).

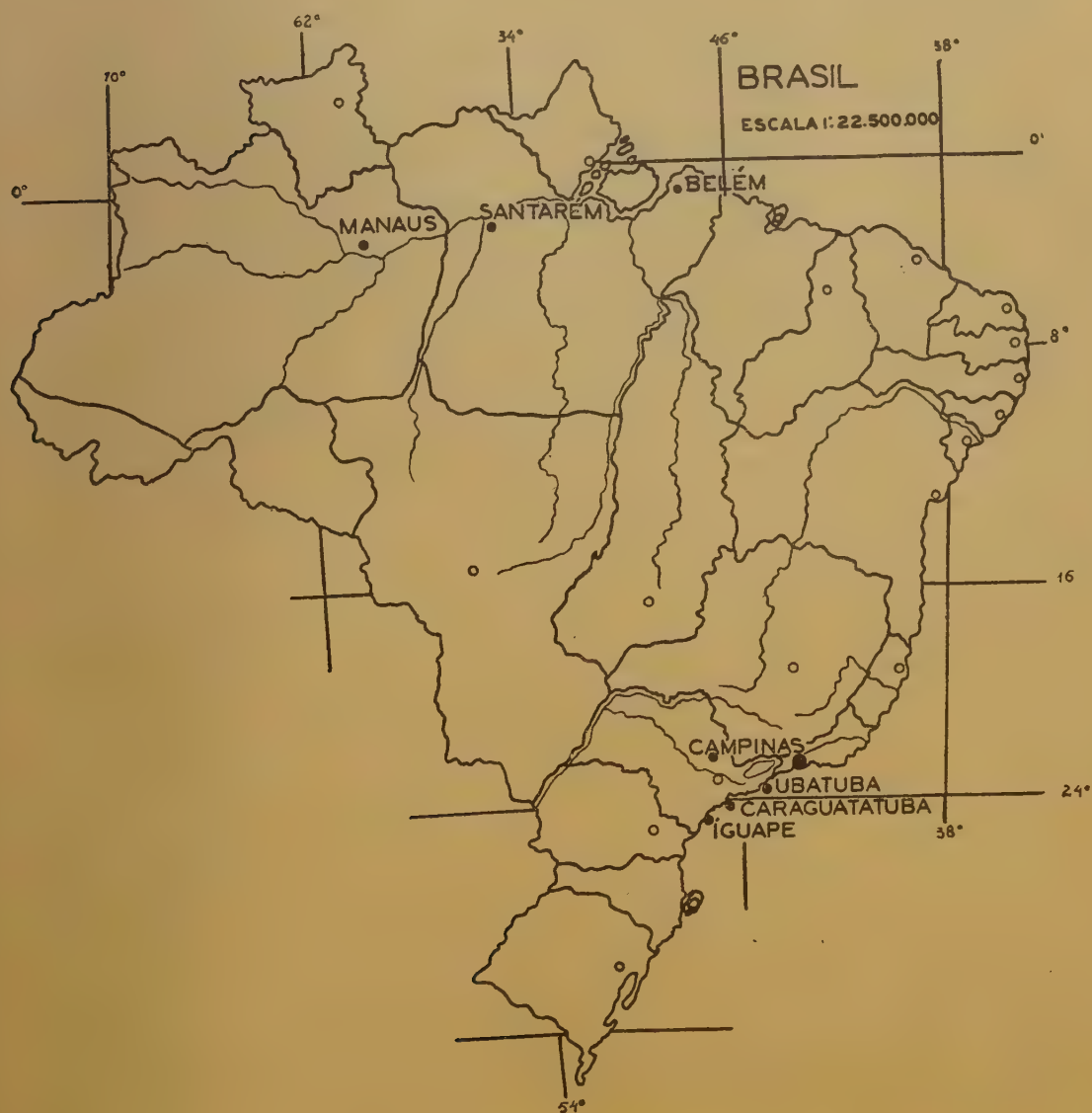


Fig. 1 — Mapa do Brasil, mostrando os lugares onde se acham as plantações de seringueira onde foi encontrada a antracnose maculada

Posteriormente a antracnose maculada foi reconhecida em outras culturas de seringueira no Estado de São Paulo, isto é, em Iguape, 1954 (IB 6522), e em Campinas, 1955 (IB 6550).

Entre os mais recentes espécimens da nova doença, que temos recebido, dois são da Amazônia, ou seja das plantações de Belterra, Estado do Pará. Eles consistem em fôlhas remetidas em 1955, por GORENZ que as colheu em viveiros (IB 6506, 6508).

As diversas localidades em que a doença foi encontrada no Brasil estão indicadas no mapa da figura 1.

Importância

Com o atual conhecimento limitado que temos da antracnose maculada, há poucos dados sôbre a sua destrutividade. RANDS, em Cuyotenango, Guatemala, observou que a doença causava poucos danos. Em Ubatuba (1951) e Caraguatatuba (1953), entretanto, o ataque era grave (ver estampa 11, A-C e 12, A). Novamente, em 1954, ROSSETTI, visitando os viveiros de Caraguatatuba, em 15 de Julho, constatou uma infecção abundante das fôlhas e hastes novas (ver estampa 12, B-F). Os ataques graves da doença podem causar a queda das fôlhas, conforme foi observado por GORENZ em Belterra.

SINTOMAS

Nas fôlhas

Os dois primeiros espécimens do litoral de São Paulo (Ubatuba e Caraguatatuba) servem de base para a seguinte descrição dos sintomas da antracnose maculada da seringueira nas fôlhas.

O exemplar de Ubatuba (IB 5785) apresenta manchas de dimensões variáveis, havendo umas pequenas, arredondadas e pouco visíveis, com 0,1 - 0,5 mm de diâmetro e outras maiores, irregulares, frequentemente perfuradas. As manchas produzem hipoplasia e marcadas distorções, e mesmo dilacerações, dos tecidos das margens das fôlhas (Est. 11, A e B).

No exemplar de Caraguatatuba (IB 6118) as fôlhas mais novas apresentam manchas pouco numerosas, muito pequenas, esparsas ou, mais frequentemente, agrupadas em grande quantidade em áreas mais ou menos extensas da fôlha que enrugam ou deformam. Estas deformações são devidas a que as lesões são produzidas em fôlhas ainda muito novas, em estado de desenvolvimento rápido, desenvolvimento este que as lesões de certo modo tolgem, local-

mente. Resulta daí um crescimento desigual das diversas partes do limbo folhar, com distorções mais ou menos acentuadas dos tecidos (Est. 11, C).

Algumas manchas são epifilas, mas a maior parte são hipofilas, ou menos frequentemente anfígenas, redondas, ou irregulares, coalescentes quando agrupadas, levemente salientes, com centro deprimido e as vezes perfurado, produzindo ocasionalmente uma ligeira invaginação do limbo e desta forma, no lado oposto da fôlha, uma saliência pronunciada, coroada pela lesão. Este sintoma também é encontrado em outras doenças deste grupo, como por exemplo a verugose da laranjeira doce (BITANCOURT e JENKINS 1937, Est. 5, A). Em conjunto as manchas da doença da seringueira têm coloração parda avermelhada (*vinaceous brown*) ⁽⁷⁾ mas com a lupa verifica-se que o centro deprimido tem coloração diferente da margem saliente das manchas, às vezes mais escuro, outras vezes mais claro, sendo o esclarecimento da mancha o resultado da seca e esvaziamento mais ou menos completo das células superficiais do tecido do hospedeiro. As manchas medem 0,1 a 0,5 mm. de diâmetro no limbo, sendo alongadas as que se acham sobre as nervuras, a maioria delas na face inferior da fôlha. Em tôrno das manchas o limbo é muitas vezes tinto por um pigmento vermelho escuro.

Nas fôlhas mais idosas do mesmo espécimen, com lesões epifilas ou anfígenas (Est. 12, A), encontram-se manchas maiores, com 0,5 a 1,5 mm de diâmetro, muito irregulares, com centro branco devido à seca e esvaziamento completo das células do limbo, frequentemente dilacerado e perfurado, e fina linha marginal sinuosa, estreita, com 0,05 a 0,15 mm de largura, saliente, de côr parda escura. Há manchas ainda maiores, arredondadas, que devem as suas grandes dimensões sem dúvida aos parasitas secundários que invadem os tecidos da fôlha em torno da lesão inicial produzida pelo agente causal.

Alguns outros sintomas das fôlhas são mais visíveis ou acentuados em outros espécimens da antracnose maculada. Deve-se mencionar em particular o enrugamento do limbo em consequência de forte infecção da nervura principal, ocorrida quando a fôlha ainda não se tinha completamente expandida (IB 6256, 6258). O mesmo sintoma acha-se bem ilustrado, em outras antracnoses maculadas como por exemplo, na antracnose do genipapeiro (*Genipa americana* L.) (BITANCOURT, 1937, Est. 30, A; JENKINS e BITANCOURT 1939, Est. 3, B).

(7) As cores são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês é baseada em Ridgway (1912).

Em outro espécimen (IB 6281) há numerosas lesões no ápice de algumas fôlhas determinando o enrugamento e redução dos tecidos do limbo, e a torção da nervura principal e das nervuras laterais, com concavidade virada para o eixo da folha. Esta deformação, que às vezes produz o desaparecimento da parte apical da fôlha, deixando um ângulo reentrante bem nítido, dá à fôlha um aspecto característico que se acha ilustrado também no caso da antracnose da roseira (*Rosa* spp.) (Cf. JENKINS 1932, Est. 2, B e JENKINS e MASSEY 1938, Fig. 2, C).

Lesões distribuídas em círculos, não raro encontradas nas antracnoses maculadas (por exemplo, cf. JENKINS 1931, Fig. 2, B) podem ser observadas na fôlha de seringueira (IB 6281) representada na estampa 12, B. As áreas claras nesta fôlha correspondem a concavidades que se manifestam como saliências na face superior da fôlha (Est. 12, C). Neste caso, cerca de 25 lesões podem estar agrupadas na página inferior das manchas, algumas delas visíveis na página superior.

Diversos espécimens da Bacia Amazônica (Manaus IB 4444, Belem IB 4448, Belterra IB 6506 e 6548) ilustram o pequeno tamanho das lesões de antracnose maculada da seringueira, assim como sua predominância na face inferior da fôlha. Nos espécimens de Belterra verifica-se também o agrupamento das manchas em certas áreas que ficam deformadas (Est. 12, I e J). As manchas aqui têm superfície lúzia com se estivesse cobertas por uma resina. Também elas apresentam um halo quando vistas a contra-luz. Este último sintoma, visível ao olho nú, acha-se ilustrado no caso da antracnose maculada de *Cornus florida* L. (WEBER 1952, fig. 2, reproduzida em COX 1953).

Nos pecíolos e hastes

Os pecíolos ostentam manchas ou cancras mais ou menos alongados no sentido do comprimento desses órgãos (IB 5785, 6256, 6281). Lisos e lúzios quando pequenos, os cancras são usualmente um tanto salientes, com centro plano ou um pouco deprimido e mais ou menos enrugado, às vezes fendilhado longitudinalmente e deixando ver os tecidos subjacentes, dilacerados, do hospedeiro. As manchas podem coalescer pelas extremidades, formando um cancro linear mais ou menos extenso. As margens das manchas são salientes e lúzias, de cor avermelhada, às vezes com aureola de coloração avermelhada por infiltração de um pigmento produzido na lesão, e o centro é mais claro por esvaziamento mais ou menos completo das células do hospedeiro (Est. 12, D).

Nas hastes novas (IB 6281) os cancrios têm quase o mesmo aspecto que nos pecíolos, mas são mais circulares e têm dimensões um tanto maiores, medindo até 2 mm (Est. 12, E e F).

Sinais

Os sinais da antracnose maculada são constituídos pelas frutificações do patógeno. Nas folhas velhas (Est. 12, A) eles consistem em ascomas que se mostram como pequeninos pontos escuros, circulares, ligeiramente ovalados ou mais ou menos irregulares, de 0,1 a 0,25 mm de diâmetro. Eles são mais abundantes nas lesões onde se desenvolveram fungos secundários cujas frutificações é às vezes difícil distinguir dos ascomas (Est. 12, G). Entre os parasitas secundários observa-se com maior frequência a alga *Cephaleuros* sp. cujos talos brancos esverdeados, mais ou menos liquenizados, iniciam o seu desenvolvimento, quase sempre, num ou mais pontos da periferia das manchas, estendendo-se em seguida por cima de toda a margem saliente, formando, com seus esporangióforos, uma coroa de aspecto característico. (IB 6256 e 6258).

As frutificações da forma imperfeita são pouco conspicuas e somente podem ser vistas, com o auxílio de uma lente de forte aumento, nas lesões do pecíolo, como manchinhas mal definidas (IB 6550).

A antracnose maculada comparada com a queima das folhas

Pela descrição que demos da antracnose maculada verifica-se que ela apresenta diversos caracteres em comum com a queima da folha, doença de considerável importância econômica também conhecida na América tropical. Em primeiro lugar, além de produzir igualmente manchas das folhas, ela ataca somente tecidos novos e tenros. Em segundo lugar pode produzir perfurações do limbo e dilacerações, principalmente nas bordas.

De outro lado, um exame mais detalhado dos sintomas permite separar a antracnose maculada da queima das folhas. Para mencionar apenas as manchas das folhas, por exemplo, as que a antracnose maculada produz são bem delimitadas e uniformemente pequenas (até 1,5 mm de diâmetro) ao passo que na doença da *Dothidella* as manchas variam desde muito pequenas até relativamente grandes (ver RANDES 1924 e WEIR 1926) e podem ser muito menos distintas. Quanto às frutificações do patógeno que constituem os sinais da nova doença elas são pouco visíveis e comparativamente raras nos espécimens que pudemos examinar. Ao contrário, mesmo

se considerarmos somente os picnídios da *Dothidella*, estes são proeminentes e geralmente abundantes e permitem facilmente a diagnose da doença (Est. 13).

ETIOLOGIA

Classificação do patógeno

As frutificações da forma perfeita ou ascomas, encontradas no primeiro espécimen coletado em Caraguatatuba (IB 6118) permitiram a identificação positiva do patógeno da antracnose maculada da seringueira, como pertencente ao gênero *Elsinoë* RAC. emend. JENKINS & BITANC., cuja forma imperfeita é *Sphaceloma* D. BY, emend. JENKINS & BITANC. (JENKINS e BITANCOURT 1941). *Elsinoë* pertence à família das Elsinoaceas (Miriangiales).

Morfologia do patógeno

No microscópio os ascomas deixam ver por transparência uma grande quantidade de ascos redondos intimamente justapostos, enchendo literalmente o ascoma até a periferia. Em seções transversais eles mostram-se intraepidérmicos, rompendo as paredes externas das células da epiderme, pulvinados, porém pouco espessos e com a parte superior plana, feitos de um pseudoparênquima hialino muito reduzido pois os ascos enchem praticamente o ascoma. Na parte externa as células do pseudoparênquima formam um epitecio de 2 a 3 camadas de células achatadas e escuras. Os ascomas medem 45 a 250 μ de diâmetro e têm cerca de 30 μ de espessura. (Est. 11, E e Est. 12, H).

Os ascos, distribuídos numa só camada, são intimamente aderentes entre si, globosos ou ovalados, e medem de 19 a 27 μ de diâmetro. Eles contêm até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 ou 4 septos transversais e um ou mais septos longitudinais, ligeiramente contritos nos septos e com as células superiores mais largas que as inferiores. Medem 14-19 x 5-8 μ .

As frutificações da forma imperfeita (IB 6550) são acérvulos intraepidérmicos, irrompentes, porém permanecendo em parte cobertos ou envoltos pelas paredes externas das células epidérmicas, medindo 30-60 x 25 μ , constituídos por um estroma reduzido a uma ou duas camadas de células isodiamétricas, as externas escuras, as internas hialinas, assentadas sobre um plectênquima hialino pouco desenvolvido, e suportando uma paliçada de conidióforo escuros, intimamente aderentes entre si, unicelulares, geralmente alongados, medindo 5-12 x 4-5 μ . Não foram vistas conídias. (Est. 11, D).

Em várias fôlhas inoculadas em 12 e 13 de Fevereiro de 1954 (ver. p. 59), a forma imperfeita se desenvolveu profusamente em tôda a superfície das lesões, constituindo às vezes uma almofada estromática côr de rosa, bem saliente, lembrando o soro de uma Uredinale. Às vezes, porém, as frutificações da forma imperfeita nessas lesões estavam reduzidas a feixes de conidióforos hialinos, bicelulares, com célula inferior mais ou menos globosa, com 2 a 3 μ de diâmetro e a célula superior estreita e alongada, com ápice atenuado, frequentemente piriforme; ou feitos de 3 a 4 células constritas nos septos (Est. 11, F). Os conidióforos destas fôlhas inoculadas são oriundos de um estroma que pode ser fracamente desenvolvido, reduzido a uma ou duas camadas de células, ou ao contrário formar um verdadeiro esporodoquio saliente, onde os conidióforos intimamente coalescentes formam uma paliçada. Tal esporoquio pode alcançar mais de 30 μ de espessura e cerca de 50 μ de diâmetro ou mais, cobrindo tôda a superfície da mancha onde se desenvolve.

Com relação à ausência de conídias nas frutificações vegetativas que acabam de ser mencionadas, convem lembrar que, neste grupo de fungos, as conídias se desenvolvem rapidamente, dadas condições favoráveis de ambiente. Um exemplo dos estágios sucessivos da formação conidiana no gênero *Sphaceloma* foi fornecido por GOURAND e BERGERON no caso do tipo do gênero, *S. ampelina* (ver JENKINS e BITANCOURT 1943). Outros exemplos são relativos a *Elsinoë veneta* (BURK.) JENKINS, por BURKHOLDER (1917) e *S. rosarum* (PASS.) JENKINS, por MASSEY (1952).

Nome e diagnose do patógeno

Esta é a primeira espécie de *Elsinoë* encontrada em *Hevea*, mas diversas espécies do gênero, num total de nove, foram descritas em outros gêneros das Euforbiaceas (BITANCOURT [e JENKINS] 1954)⁸. Entre elas, quatro espécies são conhecidas na forma perfeita. Estão enumeradas a seguir, com seu hospedeiro e a tribo das Euforbiaceas a que pertence, de acôrdo com PAX (1896), assim como sua distribuição geográfica.

1) *E. antidesmae* RAC. (RACIBORSKI 1900), sobre *Antidesma heterophylla* Blume (Phyllanthaceae), de Java.

2) *E. brasiliensis* BITANC. & JENKINS (BITANCOURT e JENKINS 1942), sobre *Euphorbia hyssopifolia* L.? (Euphorbiae), do Brasil.

(8) O texto completo dessa publicação, por Jenkins e Bitancourt, está em preparação.

3) *E. jatrophae* BITANC. & JENKINS (BITANCOURT e JENKINS 1950), sobre *Jatropha curcas* L. (Jatrophae), da América Central.

4) *E. venezuelensis* BITANC. (BITANCOURT 1945), sobre *Croton glandulosus* L. (Crotonae), da Venezuela.

Para determinar se a *Elsinoë* da *Hevea brasiliensis* pertence a uma dessas espécies, certos aspectos taxonômicos que lhe são aplicáveis, como por exemplo os que foram mencionados na descrição de *E. cinchonae*, devem ser considerados (ver JENKINS 1945; também, com referência mais detalhada à especialização de hospedeiros destes fungos, ver JENKINS 1947b).

E' certo que não precisamos considerar a possibilidade de identidade específica da *Elsinoë* da seringueira com *E. antidesmae*, parasita de uma Euforbiacea do Velho Mundo, taxonômicamente bem afastada de *Hevea*. *E. jatrophae*, cujo hospedeiro pertence à mesma tribo que *Hevea* tem ascomas muito rudimentares, assim como ascos e ascospóros muito menores que os da espécie em apreço. Esta última parece mais com as outras duas *Elsinoaceas* da lista acima, embora seja possível distinguir em cada caso diferenças morfológicas. Além disto, os hospedeiros dessas duas espécies não somente pertencem a outros gêneros da grande família das Euforbiaceas, como também a outras tribos. Nestas condições parece preferível classificar a *Elsinoë* da seringueira como espécie distinta. A diagnose é a seguinte:

Elsinoë heveae sp. nov.

Maculis in foliis paucis usque numerosissimis, sparsis vel frequenter congregatis, areas parvas vel extensas formantibus, vulgo hypophyllis, raro epiphyllis vel amphigenis, circularibus, 0,1 — 0,5 mm latis, brunneo-rubellis, in centrali parte depressis obscurioribus vel clarioribus quam reliquis, frequenter areola rubella cinctis; maculis in petiolis et caulibus cancerosis, oblongis, vulgo elevatis, in centrali parte planis aut depressis, rugulosis, usque 2 mm. magnis, coalescentibus, margine elevato et splendenti cinctis, brunneo-rubellis, in centrali parte clarioribus.

Ascomatibus intra-epidermicalibus, erumpentibus, pulvinatis, supra planis, pseudoparenchymatosis et hyalinis, repletis ascis uniseriatis, 42-250 μ magnis, usque 30 μ crassis; ascis globosis vel ovalibus, vulgo octosporis, 19-27 μ longis; ascosporis 3-4 transversae necnon uni vel pluries longitudinaliter septatis, leviter constrictis ad septatransversalia, superioribus cellulis largioribus, 14-19 $\times$ 5-8 μ .

Forma imperfecta: Sphaceloma heveae sp. nov.

Acervulis intraepidermicalibus, erumpentibus, 30-50 $\times$ 25 μ magnis, e stroma uni vel duoseriatis cellulis isodiametricis confectis, cellulis externis obscuris, 5-12 $\times$ 4-5 μ , in palum adunatis e plectenchymate hyalino exiguo enascentibus, internis hyalinis, cum conidiophoris obscuris copulatis, unicellularibus, elongatis, Conidiis minime visis.

Distributio geographica: Guatemala, America Centralis, Brasilia Civitatis Amazonas, Pará et S. Pauli, ubi Elsinoë heveae generat morbum dictum "Antracnose maculada da seringueira", in Hevea brasiliensi M. Arg. (Euphorb.).

Especimens examinados (9)

4444. — Sobre folíolos, Cultura da Cia. Brasileira de Plantações, K. 14, Estrada do Aleixo, Manaus, Amazonas, Brasil, 11 de Agosto de 1942, A. A. B. 955. Associada a *Dothidella ulei*.
4448. — Sobre folíolos, Instituto Agrônômico do Norte, Belem, Pará, Brasil, 14 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT 959.
5357. — Sobre folíolos, viveiros, Tululá Plantation, Madre de Dios, Cuyotenango, Guatemala, America Central, 22 de Novembro de 1948, R. D. RANDS. (NFC 90809).
5359. — Sobre folíolos, viveiros, "Entre Rios", Cuyotenango, Guatemala, 24 de Fevereiro de 1949, R. D. RANDS. (NFC 90813)
5360. — id. id. Março 1949. (NFC 90814).
5785. — Sobre folíolos e pecíolos, Estação Experimental de Ubatuba, Ubatuba, São Paulo, Brasil, Outubro 1951, J. J. HOELZ.
6118. — Sobre folíolos, Fazenda Rio Claro, Caraguatatuba, São Paulo, Brasil, 18 de Dezembro de 1953, H. F. PEREIRA (NFC 91270). Tipo da forma perfeita.
6209. — Sobre folíolos, Laboratorio da Seção de Fitopatologia, Instituto Biológico, 23/24 de Fevereiro de 1954, A. E. JENKINS e A. A. BITANCOURT (Inoculação de 29 de Janeiro de 1954).
6243. — Sobre folíolos e pecíolos, como acima, 22 de Fevereiro de 1954, A. E. JENKINS e V. ROSSETTI (Inoculação de 12 de Fevereiro de 1954).
6244. — id. id. 20/21 de Fevereiro de 1954, A. E. JENKINS. (Inoculação de 13 de Fevereiro de 1954).
- 6256 e 6258 — Sobre folíolos, Fazenda Rio Claro, Caraguatatuba, São Paulo, Brasil, Março 1954, H. F. PEREIRA. (NFC 90742, CMI, de 6256). A forma perfeita está presente, associada a *Cephaleuros* sp. em IB 6256.
6281. — Sobre folíolos, pecíolos e hastes, mesma localidade que 6118, 15 de Julho de 1954, V. ROSSETTI (NFC 90743).
- 6506 e 6508. — Sobre folíolos velhos (6506) e novos (6508), em viveiros, Plantações de Belterra, Pará, Brasil, 21 de Março de 1955, A. M. GORENZ.

(9) O número de registro do espécimen no Herbário da Seção de Fitopatologia, Instituto Biológico de São Paulo (IB) antecede, no texto, a citação de cada espécimen (ver nota 6). Nesta lista, o prefixo "NFC", seguido do número de registro, que aparece depois da citação dos espécimens, indica a parte do material que foi depositado no National Fungus Collection, Beltsville, Maryland, U. S. A. Da mesma forma, "CMI" indica material depositado no Herbário do Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, Inglaterra.

6522. — Sôbre folíolos, Campo Experimental de Iguape, São Paulo, Brasil, 21 de Abril de 1954, V. ROSSETTI.
6550. — Sôbre folíolos, pecíolos e hastes, Fazenda Sta. Eliza, Instituto Agrônômico, Campinas, São Paulo, Brasil, 1 de Setembro de 1955, V. ROSSETTI (NFC 91271, CMI). Tipo da forma imperfeita.

Conforme mencionamos anteriormente e estes espécimens mostram, *Elsinoë heveae* foi até hoje encontrada sômente em *Hevea brasiliensis* cultivada. WEIR (1926) constatou a presença de *Dothidella ulei* sôbre *Hevea* spp. selvagens, inclusive *H. brasiliensis* do Baixo Amazonas, em exemplares de herbário fanerogâmico. O exame que, da mesma forma, fizemos de material de herbário fanerogâmico, não conduziu à descoberta de qualquer espécimen de *E. heveae* mas sim de *Dothidella* (JENKINS 1956). De acôrdo com a descrição de um seringal por LA RUE (1926) as seringueiras, na natureza, estão espalhadas na mata, entre árvores de outras espécies. Por este motivo as infecções de antracnose maculada podem se achar limitadas a áreas localizadas e nunca se tornarem tão abundantes quanto, por exemplo, na plantação de Caraguatatuba, quando esta foi visitada em 15 de Julho de 1954. De qualquer forma, parece que o abundante material de herbário que examinamos não foi colhido em árvores atacadas de *Elsinoë*. Isto está em franco contraste com o que observamos nos "Espécimens examinados", de *E. cinchonae*, sôbre *Cinchona* spp. que todos eles são essencialmente de coleções fanerogâmicas (cf. JENKINS 1945).

ESTUDOS CULTURAIS

Métodos

Tôdas as culturas neste trabalho foram feitas em meio de batata-dextrose-agar de acôrdo com a formula correntemente usada para culturas de fungos na Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico (10).

As culturas em caixas de PETRI foram feitas de acôrdo com um método desenvolvido para fungos de crescimento lento (BITAN-COURT e JENKINS 1950, p. 23, est. 7, A).

(10)

"Meio de batata-dextrose-agar de Ract"

Água destilada	1000 cm ³
batata	400 g
dextrose	30 "
agar	25 "

Os tubérculos de batata, descascados e cortados em fatias finas, são imediatamente mergulhados na água destilada para evitar a oxidação e enegrecimento da polpa. Depois de cozinhado 20 minutos em autoclave a 120°C, o meio é filtrado em algodão e recebe o agar, voltando à autoclave na mesma temperatura durante 40 minutos. Depois de nova filtração em algodão, o meio recebe a dextrose e é imediatamente distribuído em tubos que são autoclavados a 120°C durante 50 minutos. Este meio difere dos meios de batata-dextrose-agar comuns pelo fato da dextrose ser acrescentada por último, depois de derretido o agar.

As comparações a temperaturas constantes foram feitas em 12 termostatos a temperaturas de 3 a 36°C, em intervalos de 3°.

Isolamentos

O microorganismo patógeno foi isolado duas vezes do primeiro espécimen recebido de Caraguatatuba (IB 6118). O primeiro isolamento (cepa 942F) foi feito por V. ROSSETTI a partir de lesões desprovidas de sinais visíveis do fungo causal. Estas lesões achavam-se reunidas na parte da fôlha da Est. 11, C que foi dissecada como se vê no ângulo inferior direito da fotografia. Finas seções foram depositadas na superfície do meio de cultura, em tubos. De outra fôlha foram conseguidas culturas a partir de um único ascosporo (cepa 944F) de ascomas de *Elsinoë*. Ambas estas cepas têm o desenvolvimento lento característico das Elsinoaceas e apresentaram-se com a superfície enrugada (culturas “convolutas”) ⁽¹¹⁾ e margens mais ou menos irregulares, porém distintas (Est. 11, H) ⁽¹²⁾.

Comparação das duas cepas

Embora exibindo as mesmas características culturais gerais, as duas cepas podiam facilmente se distinguir. Entre as diferenças que apresentavam, uma das mais notáveis era a propriedade de produzir setores de morfologia diferente do isolamento inicial, que se observava na cultura de tecido, ao passo que nenhum setor aparece na cultura monoascospórica. Este fato acha-se ilustrado na seguinte comparação cultural das duas cepas, feita em caixas de PETRI.

O meio nessas caixas foi inoculado (16 de Fevereiro de 1954) por transferência de um fragmento de talo retirado de outra cultura e semeado no centro da caixa. Foram preparadas 4 caixas (*a*, *b*, *c*, *d*) com a cepa 942F e duas (*e* e *f*), com a cepa 944F. As culturas foram mantidas à temperatura de 24°C. As observações sobre o desenvolvimento das culturas foram feitas um mês e 2 meses 1/2 depois de iniciadas.

No fim do primeiro mês, dois ou três setores tinham se desenvolvido nas 4 caixas da cepa 942F. Embora esses setores fossem enrugados com a cultura inicial, eles se distinguiam desta última pois tinham menor espessura, corrugação mais fina, eram brilhantes e com aparência de cêra. Os setores da caixa *a*, sendo de desenvolvi-

(11) Os termos “convoluta” e “pulvinado” designam tipos morfológicos de talos dos fungos deste grupo (Jenkins 1931).

(12) Uma cultura de cada isolamento inicial de *Elsinoë heveae*, cepas 942 F e 944 F, foi depositada nas seguintes coleções: American Type Culture Collection, 2029 M Street, N. W., Washington 6, D. C., Estados Unidos e Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda.

mento recente, iam pouco além da margem da cultura inicial que tinha cerca de 2 cm de diâmetro. Ao passo que esta última tinha coloração parda rosada (*pinkish buff*), os setores eram pardos claros (*cream buff*), com pequenas pontuações de pigmento vermelho, num deles. Na observação feita depois de 2 meses $\frac{1}{2}$, os dois setores tinham se desenvolvido mais que a cultura inicial, estendendo-se em leque além de sua margem. O talo todo tinha conservado côres claras.

Nas outras três caixas (*b*, *c* e *d*), os setores tinham essencialmente o mesmo aspecto. Não sòmente tinham se desenvolvido cedo, a custa da cultura inicial, mas sua côr (*Van Dyke brown* a *pecan brown*) contrastava nitidamente com a dessa cultura. Incluindo os setores que estavam começando a coalescer, os talos tinham perto de $2,5 \times 3$ cm de diâmetro (Est. 11, K). Depois de 2 meses e $\frac{1}{2}$, tinham aumentado para $4 \times 4,5$ cm. Os setores que agora constituíam a maior parte da cultura tinham se desenvolvido num talo saliente, tipicamente convoluto, com os caracteres gerais das culturas de *Elsinoë*. Pequenos filamentos brancos, curtos, cobriam a superfície úmida desta parte intensamente colorida do talo que era então de côr marrom escura avermelhada (*Hay's brown*). A cultura inicial estava praticamente eclipsada por um setor "pulvinado" de coloração clara. Este setor correspondia, quanto ao seu aspecto, aos das culturas em tubos do fungo de onde se originara este tipo de setor.

As duas culturas provenientes do isolamento monoascospórico (cepa 944 F) produziram um tipo de crescimento convoluto, característico do isolamento inicial. Depois de um mês os talos tinham alcançado cerca de 2 cm de diâmetro. A cultura da caixa *e* tinha então côr parda escura (*moss brown*), visível debaixo de uma penugem clara que cobria a superfície da cultura. Na caixa *f*, a cultura, que não tinha essa penugem, tinha coloração parda escura no centro (*sayal brown*) e parda clara (*cinnamon buff*) na área marginal (Est. 11, J). Depois de 2 meses e $\frac{1}{2}$, as duas culturas eram de côr lilaz escura (*vinaceous lilac*) com margem purpurea (*Corinthian purple*).

No momento das primeiras observações, depois de um mês, as culturas em caixa de PETRI não tinham manifestado qualquer modificação na côr do meio de cultura na vizinhança dos talos. Na segunda observação, entretanto, verificou-se uma pigmentação avermelhada em torno das duas culturas de 944 F e nas de 942 F, estas últimas com coloração intensa. Este tipo de cromogênese não é raro

em culturas de *Elsinoë*. Em outras culturas de 942F, feitas em tubos e desenvolvidas durante um mês na temperatura ambiente, observou-se uma pigmentação menos comum, de coloração amarela esverdeada.

Crescimento do fungo a temperaturas constantes

Para estudar a influência da temperatura sôbre o crescimento de *Elsinoë heveae* em cultura, foram colocadas às diferentes temperaturas, acima indicadas, duas culturas diferentes da cepa 942 F. Uma delas, que designaremos por 942 Fc, tem o hábito de crescimento convoluto, isto é, o da cultura 942 F original, isolada da seringueira. A outra, designada por 942 Fp, apresenta o tipo pulvinado de crescimento e teve por origem um setor pulvinado de 942 F. Depois de 4 semanas foram medidos os diâmetros médios, o peso fresco (f) e o peso seco (s) de cada cultura e anotadas observações sôbre o hábito de crescimento, a coloração e outros aspectos dos talos. A tabela 1 fornece o resultado das medições de diâmetro e peso, assim como a relação f-s/f que dá o teor em água dos talos. As figuras A e B, estampa 14, representam respectivamente as culturas 942 Fc e 942Fp a cada uma das 12 temperaturas constantes.

TABELA 1

Diametro em milímetros, peso fresco (f) e peso seco (s) em miligramas e relação f-s/f de culturas de 4 semanas da cepa convoluta 942 Fc de *Elsinoë heveae* e do setor pulvinado dessa cepa (942 Fp), crescidas a diversas temperaturas. Média de 5 talos, salvo quando indicado em contrário

Temperatura °C	Diametro		Peso fresco f		Peso seco s		Relação f-s/f	
	942 Fc	942 Fp	942 Fc	942 Fp	942 Fc	942 Fp	942 Fc	942 Fp
3	2,3	2,6 ^a	11,2	6,2	2,2 ^c		0,75	
6	5,3 ^a	3,2	62,2 ^a	19,8	9,0 ^c		0,76	
9	6,6	5,0	115,8	78,2	20,5	11,8	0,82	0,85
12	10,4	7,6	254,2	148,0	44,4	21,4	0,83	0,86
15	12,8	12,0	311,4	229,0	53,6	34,2	0,83	0,85
18	15,4	16,0	359,2	491,0	67,2	48,8	0,81	0,90
21	17,8	18,2	410,4	691,8	68,0	65,8	0,83	0,90
24	20,0	20,4	568,4	830,2 ^a	72,2	88,8	0,87	0,89
27	19,6	19,4	667,0	944,0	73,0	74,2	0,89	0,92
30	18,3 ^a	14,6	534,6	732,8	61,6	65,0	0,88	0,91
33	12,7 ^b	10,8	345,0 ^b	257,8	60,3	55,4	0,83	0,79
36	1,0	1,0	1,7 ^d	1,2 ^e	0	0	—	—

a média de 4 talos

b média de 3 talos

c culturas convolutas e pulvinadas pesadas juntas

d média de 5 talos pesados juntos

e média de 4 talos pesados juntos

Pela tabela vê-se que os diâmetros dos talos, nas temperaturas médias, foi sensivelmente o mesmo para ambas as estirpes. A estirpe pulvinada (942 Fp) apresentou diâmetro ligeiramente menor nas temperaturas extremas. As duas estirpes cresceram muito pouco a 3° e não cresceram absolutamente a 36°. O máximo de crescimento em diâmetro verificou-se a 24° para ambas. O peso fresco de 942 Fp, nas temperaturas médias de 18 a 30°, foi consideravelmente maior que o de 942 Fc, mas isto foi quase exclusivamente devido ao maior teor em água da primeira, pois as diferenças entre os pesos secos não foram tão grandes. O máximo peso fresco das duas estirpes foi alcançado na temperatura de 27°, em vez de 24° que se verificou para os diâmetros, mas o máximo de peso seco foi observado a 24° na estirpe pulvinada. Nas duas estirpes o teor em água é maior nas temperaturas mais favoráveis ao crescimento. O pigmento vermelho, que dá à estirpe convoluta a sua coloração típica, vinacea, forma-se pouco à temperatura de 9° e não se forma absolutamente a 6°. Nesta temperatura a cultura tem coloração parda (*wood brown*).

A estirpe convoluta mostrou nesta experiência a sua habitual instabilidade, formando nas temperaturas de 9 a 30°, numerosos setores pulvinados que, nas temperaturas mais favoráveis, chegaram a cobrir quase completamente as partes convolutas dos talos. Nas temperaturas extremas, 6 e 33°, os setores pulvinados mal se distinguíam das partes convolutas dos talos, que tinham, aliás, convoluções maiores que nas temperaturas médias. (Est. 14, A e C).

Como é possível constatar na estampa 14 B, a estirpe pulvinada apresentou-se com seus caracteres típicos, — isto é com talo pulvinado coberto de penugem branca, — somente nas temperaturas de 9 a 30°. A temperaturas mais baixas ou mais elevadas, isto é a 6° e a 33°, os talos eram convolutos e na verdade não podiam, na temperatura de 33°, ser diferenciados à primeira vista, dos da estirpe convoluta.

Em um dos talos convolutos de 942 Fp, a 33° C, se desenvolveram dois setores diferentes, ambos convolutos. A estampa 14, D, representa esse talo e os seus dois setores estão designados por “a” e “b”. Tais setores apresentavam pequenas diferenças de coloração, e as convoluções do setor a eram um tanto mais finas que as do setor b.

Repicagens desses setores, cultivadas a 24° e a 33° C comportaram-se de uma maneira totalmente diferente na temperatura mais baixa: uma delas apresentou-se convoluta às duas temperaturas (Est. 14, E), ao passo que a outra tinha hábito pulvinado a 24°C

e convoluto a 33°C, como a cultura original 942 Fp (Est. 14, F). Deve-se concluir que a cepa 942 Fp, quer desde sua origem, como setor da cepa convoluta (942 Fc), quer por mutação posterior de parte de seu talo, — é na realidade composta de duas estirpes, uma convoluta e outra pulvinada, sendo a primeira, nas temperaturas médias, completamente escondida pela segunda.

De *Elsinoë australis* BITANC. & JENKINS, uma espécie que, como *E. heveae*, exhibe em cultura uma grande instabilidade, foi feito um estudo de diversas estirpes (BITANCOURT e JENKINS 1936c) algumas das quais apresentam os caracteres das estirpes de *E. heveae* que acabam de ser descritas.

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS

Métodos

Foram feitas inoculações em folíolos muito tenros de fôlhas em início de desenvolvimento de seringueiras em vaso, mantidas em estufa. O inóculo consistiu em culturas puras da cepa 942F (ver p. 53) em meio de batata-dextrose-agar. Essas culturas foram esmagadas em água esterilizada, formando uma suspensão espessa de fragmentos de talo do fungo. A suspensão foi aplicada às fôlhas. Em tôdas as experiências o tratamento das testemunhas sòmente diferiu das inoculadas pela ausência do inóculo. As plantas assim inoculadas e as testemunhas foram mantidas em câmara úmida durante 48 horas, depois do que permaneceram sôbre uma mêsa de laboratório.

Este é essencialmente o método seguido em experiências de inoculação, por exemplo com *Elsinoë mangiferae* BITANC. & JENKINS sôbre mangueira (BITANCOURT e JENKINS 1946) e *Sphaceloma papayae* JENKINS & BITANC. sôbre mamoeiro (WALLACE, JENKINS e BITANCOURT 1955). Este método foi originalmente desenvolvido por WINSTON (1923) para fazer inoculações no campo com o organismo da verrugose da laranjeira azêda (*E. fawcetti* BITANC. & JENKINS, BITANCOURT e JENKINS 1936a).

Unicamente a forma imperfeita desses fungos foi até hoje observada em cultura e sòmente em pequeno número de espécies. Ela não foi encontrada nas culturas de 942 F usadas como inóculo. E' possível, entretanto, que as conídias tenham sido produzidas nos fragmentos de talo usados como inóculo, logo estes foram transferidos para o ambiente úmido da câmara de inoculação, como acontece com outras Elsinoaceas (ver por exemplo BURKHOLDER 1917, no caso

de *E. veneta* e JENKINS 1936, no de *E. ampelina* SHEAR (*Sphaceloma ampelina*) e *E. fawcetti*). Caso isto não tenha acontecido, é provável que as células hifais se comportaram mais ou menos como clamidosporos, desempenhando o papel das conídias na infecção do hospedeiro. É esta, essencialmente, a explicação que WINSTON (1923) dá para as infecções que obteve, nas suas numerosas experiências de inoculação com *E. fawcetti*.

Inoculações

Na primeira experiência, feita em 29 de Janeiro de 1954, 12 folhas medindo de 3,5 a 9 cm de comprimento, todas na mesma planta, foram inoculadas, aplicando-se-lhes, na página inferior, pequenos pedaços de papel filtro que foram antes mergulhados na suspensão de inóculo.

Sobre todas as folhas de seringueira inoculadas com *Elsinoë heveae* desenvolveram-se lesões típicas de antracnose maculada em uma ou mais áreas de inoculação. Essas lesões tornaram-se visíveis após uma semana, isto é, vistas com uma lente de mão podiam ser observados pequenos pontos translucidos, turgescentes, com aparência de estarem infiltrados de água. Ao fim de duas semanas, quando as folhas tinham praticamente atingido o seu completo desenvolvimento, a maior parte das lesões tinham-se tornado pardas-avermelhadas no centro. Muitas ainda permaneciam com as margens turgescentes. Mesmo quando completamente desenvolvidas, as lesões eram muito pequenas, medindo bem menos de 1 mm de diâmetro. A estampa 11, G, mostra a área mais profusamente infetada como resultado desta experiência, em uma folha completamente desenvolvida. Nesse caso a inoculação foi feita na página inferior da folha. As lesões logo penetraram no tecido, e a página superior das folhas também se tornou amarelada na área mais infetada. A expansão da folha na zona doente foi muito reduzida, em comparação com a do tecido sadio.

Examinadas ao microscópio, as lesões resultantes das inoculações de 29 de Janeiro (IB 6209) mostraram-se desprovidas de sinais do fungo causal. Micro-culturas de tecidos dessas lesões, entretanto, produziram, em tubos, talos de crescimento análogo ao das culturas inoculadas (Est. 11, I). Depois de algumas semanas de idade essas culturas produziram no meio a coloração amarela esverdeada, observada na cultura original (942F).

A segunda experiência de inoculação, feita em 12 de Fevereiro de 1954, correspondeu essencialmente àquela que acabamos de descrever, mas as folhas inoculadas eram menores, medindo de 2,5 a 4 centímetros de comprimento, e o inóculo foi aplicado em áreas relativamente maiores das folhas. Na terceira experiência de inoculações, em 13 de Fevereiro, o inóculo foi aplicado com um pequeno pincel de pêlo, em folhas medindo apenas de 1,2 a 2,5 cm de comprimento. De ambas as experiências resultaram infecções extremamente abundantes. As lesões desenvolveram-se entre as nervuras, porém, mais comumente, perto ou em cima das nervuras, na página inferior da folha. Os pecíolos tenros, que também foram inoculados, mostraram igualmente infecções. A forma imperfeita do patógeno ou *Sphaceloma*, desenvolveu-se profusamente nas lesões destas folhas inoculadas (IB 6243-44) (Est. 11, F, ver também p. 49). Nestas experiências as pequenas folhas não se desenvolveram normalmente e começaram a murchar e cair em uma semana ou pouco mais. Sem dúvida, nas folhas inoculadas em 13 de Fevereiro, e em muitas das inoculações feitas em 12 de Fevereiro, a infecção foi demasiadamente intensa, impedindo o desenvolvimento das folhas. A verrugose de *Solidago* spp, causado por *Elsinoë solidaginis* JENKINS, fornece um exemplo da falta de desenvolvimento das folhas devido a uma grave infecção natural no momento, em que estes órgãos começam a se expandir (ver JENKINS e UKKELBERG 1935, Est. 1).

As testemunhas em tôdas as inoculações, permaneceram sãs.

Estas experiências provam conclusivamente que *Elsinoë heveae* é a causa da antracnose maculada da seringueira.

Ciclo evolutivo

RANDS (1924) mostrou que, pelo menos nas condições das Guianas, há nos pés de seringueira, folhinhas novas suscetíveis à infecção por *Dothidella ulei* durante praticamente o ano todo.

Como *Elsinoë heveae* também infecta somente os tecidos novos e tenros, a presença de tais tecidos o ano inteiro desempenharia, no seu caso, igualmente, um papel importante no ciclo evolutivo do parasita. Ascosporos, formados nos ascomas das folhas velhas, assim como conídias das frutificações vegetativas das hastes e folhas novas, devem servir como inóculo para a infecção inicial. Os órgãos da seringueira que acabam de ser mencionados são os em que observamos o fungo no decorrer dos presentes estudos. Sem dúvida deve haver também inóculo presente em outros órgãos, como as frutas, infetadas quando ainda novas.

Com a presença de tecidos novos em estado de crescimento, suscetíveis à infecção, em diversos órgãos e debaixo de condições favoráveis de temperatura e umidade, o ciclo evolutivo, principiando com a forma perfeita, tem provavelmente o seguinte andamento: O asco, rompendo sua parede externa, não extensível, expande-se para fóra do ascoma, expulsando os ascosporos. Este fenómeno foi bem descrito por BURKHOLDER (1917) no caso de *Elsinoë veneta*. Os ascosporos levados pelo movimento do ar até os tecidos novos acima mencionados, germinam, produzindo tubos germinativos ou esporos secundários que, por sua vez germinam, conforme se observa por exemplo em *E. australis* (BITANCOURT e JENKINS 1939, Est. 18, A-G). Da mesma forma, as conídias produzidas nas frutificações vegetativas ou acérvulos, alcançando a superfície dos tecidos infectíveis, provavelmente graças aos respingos de chuva, germinam prontamente. A infecção, quer a partir de ascosporos, esporos secundários ou conídias, se processa conforme foi descrito na relação das nossas experiências de inoculação. Conídias formadas nas lesões novas produzem então infecções secundárias nos tecidos novos presentes no momento, em alguns casos talvez no próprio órgão em que foram produzidas.

Uma experiência de inoculação com *Elsinoë australis* em que se verificou sucessivamente infecção primária e infecção secundária no mesmo órgão (fruta), foi descrita em outra publicação (BITANCOURT e JENKINS 1937).

No que diz respeito à época de aparecimento da forma perfeita de *Elsinoë heveae*, sabemos tão somente que ela se achava presente em folhas velhas, colhidas em seringueiras, em Caraguatatuba, no mês de Dezembro. Tomando ainda como exemplo *E. australis*, a forma perfeita foi encontrada primeiramente em Julho (1936) em frutas maduras de laranja Bahia de Torrinha, no interior do Estado de São Paulo (BITANCOURT e JENKINS 1936b) e noutra ocasião em uma fruta de laranja doce, da variedade "tangerina", colhida em Montenegro, Rio Grande do Sul em Abril (1937) (BITANCOURT e COSTA NETO 1950).

RANDS refere-se ao "annual wintering period" que seria um período de repouso da vegetação, durante o qual as árvores se despem de suas folhas. Admitindo-se que a antracnose maculada esteja presente durante esse período, deve-se esperar que o patógeno "hiberna" nos cancrios das hastes, no estado puramente vegetativo. Quando começa o desenvolvimento de novas folhas, conídias formadas nos cancrios podem infetar esses órgãos ainda tenros. É o que ocorre

com algumas antracnoses maculadas debaixo das condições dos climas temperados, com inverno bem caracterizado, como mostram os cuidadosos estudos do ciclo evolutivo de *Elsinoë veneta* (BURKHOLDER 1917) e de *Sphaceloma rosarum* (MASSEY 1952).

COMBATE

O nosso estudo da antracnose maculada da seringueira não se estendeu aos métodos de contrôlle da doença. Limitaremos portanto as nossas considerações ao que diz respeito ao combate por meio de fungicidas, caso ele se mostre de interesse prático, como, por exemplo, em viveiros. Além disto nos restringiremos a reunir recomendações mais ou menos recentes sôbre o combate a diversas outras antracnoses maculadas que atacam árvores cultivadas. Uma delas, como veremos, é principalmente uma doença de viveiros.

Estas doenças de árvores e os fungicidas que foram recomendados para seu combate são os seguintes: verrugose do abacateiro, calda bordalêsa ou óxido cuproso (ANON. 1953); verrugose da laranjeira azêda, calda bordalêsa (ANON. 1953); antracnose maculada de *Cornus florida*, manzate e alguns outros fungicidas (COX 1953); queima dos viveiros do pecan, calda bordalêsa e destruição das fôlhas velhas (PHILLIPS, COLE e LARGE 1952). No caso da antracnose maculada de *Cornus*, COX diz que a calda bordalêsa deu bons resultados mas produziu alguns danos à folhagem. Este fungicida, como é sábio, tem sido usado há muito tempo para combater a antracnose maculada clássica, ou seja a "antracnose da videira". O controle dessa doença, dado numa das citações acima (ANON. 1953) é recomendado como segue: "Destruição de tôdas as partes doentes da videira, pulverização de calda sulfo-cálcica e em seguida de calda bordalêsa".

STUDIES IN THE MYRIANGIALES

VIII. SPOT ANTHRACNOSE OF HEVEA, CAUSED BY ELSINOË

A b s t r a c t

The authors report a new disease of hevea (Hevea brasiliensis), which they call "hevea spot anthracnose". Places and dates of its discovery, in all cases in plantations, are as follows: in Brazil, Manaus, Amazonas (1942); Belém (1942) and Belterra (1955), Pará; Ubatuba (1951), Caraguatatuba (1953), Iguape (1954), and Campinas (1955), State of São Paulo, besides Cuyotenango in Guatemala (1948-1949). As yet little is known about the harmfulness of the disease. Available data show, however, that young shoots may be severely affected and that leaf fall may occur.

Leaf spots are scattered over the blade or concentrated chiefly on its apical half. Often hypophyllous, they are circular to irregular, up to 1.5 mm in diameter, with a salient margin. They are vinaceous brown, usually pale at the center, where the tissue may be somewhat lacerated. Lesions on veins, petioles and stems are generally similar to the leaf spot, though they are more or less elongated, reaching 2 mm in length. Frutifications of the pathogen, as signs of the disease, consist of minute dark punctations, ascomata, seen on old leaf spots and exceedingly small acervuli, seen on petioles.

In common with South American leaf blight, the spot anthracnose attacks only tender growth, may cause a pronounced shot hole effect and may render leaves ragged in appearance. It may be distinguished from the blight, however, by its uniformly small, well-delimited leaf spot, together with its inconspicuous signs.

The pathogen of this new disease is described as *Elsinoë heveae* n. sp. with the name *Sphaceloma heveae* n. sp. provided for the conidial stage.

In the cultural studies the organism was grown on potato dextrose agar medium (formula given). The two original isolations, one a tissue culture (942 F), the other a single ascospore culture (944 F), produced "convolute" growth at first. Culture 942 F, sectoried freely, however, producing the "pulvinate" type of growth in these fungi. Culture 944 F remained convolute.

The two strains of 942 F were grown at 12 constant temperatures ranging from 3° to 36° C, with intervals of 3° in each case. Represented by these strains, the organism produced slight growth at 3° and none at 36°. Within these temperatures it attained its greatest diameter at 24°, likewise, its greatest fresh weight at 27°. Water content was also maximum at these temperatures. The convolute strain remained convolute at all temperatures, whereas the pulvinate strain was pulvinate from 9 to 33°, slightly convolute at 6° and entirely convolute at 33°. In a culture at this higher temperature sectors were distinguished corresponding to two strains, both convolute at 33°. Only one of them, however was pulvinate at 24°. The other, apparently convolute at all temperatures, was stable in not producing pulvinate sectors as did the original isolate.

Young tender leaves of *Hevea brasiliensis*, 3.5 to 9 cm. in length, inoculated with a culture of the *Elsinoë* became infected, and the fungus was reisolated. Leaves 1.2 to 4 cm in length when inoculated were practically ruined from the resulting severe infection.

The apparent life history of the fungus is described.

As to control, reference is made only to fungicidal treatment should this prove practical, for example, in the nursery. In this connection citations are made to comparatively recent literature giving control for several other spot anthracnoses affecting cultivated trees. Bordeaux mixture spray is recommended with one exception. In that instance it gave good control, but caused some foliage injury.

BIBLIOGRAFIA

- ANONIMO — 1953 — Distribution, symptoms and control of some of the more important plant diseases. *Plant. Dis. Rept. Suppl.* 221: 105-181.
- BITANCOURT, A. A. — 1937 — Novas espécies de *Sphaceloma* sobre *Terminalia* e *Genipa*. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 8: 197-200.
- BITANCOURT, A. A. — 1945 — Novas especies sul-americanas do gênero *Elsinoë*. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 16: 19-26.
- BITANCOURT, A. A. & COSTA NETO, J. P. — 1950 — *Elsinoaceas* do Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 20: 29-34.
- BITANCOURT, A. A. e JENKINS, A. E. — 1936a — *Elsinoë fawcetti*, the perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopathology* 26: 393-396.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1936b — Perfect stage of the sweet orange fruit scab fungus. *Mycologia* 28: 489-492.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1936c [1937] — Variações de *Elsinoë australis*. *Rodriguésia* 2 (Num. esp.): 315-317.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1937 — Sweet orange fruit scab caused by *Elsinoë australis*. *Jour. Agr. Res.* 54: 1-18.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1939 — Ciclo evolutivo de *Elsinoë australis* Bitancourt e Jenkins, agente da verrugose da laranja doce. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 10: 129-146.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1942 — New discoveries of Myrianguales in the Americas. *Proc. Amer. Sci. Cong.* 8th, Washington, 1940, 3: 149-172.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1946 — A verrugose da mangueira. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 17: 205-208.
- BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1950 — Estudos sobre as Mirianguales II. Vinte novas espécies de *Elsinoaceas* neotropicais. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 20: 1-28.
- BITANCOURT, A. A. [& JENKINS, A. E.] — 1954 — Spot anthracnoses (Abs.) In Rapports et communications parvenus avant le Congrès aux Sections 19 e 20 [Section 20, Phytopathologie]. *Congr. Internat. Bot.* 8º, Paris, 1954: 163-164.
- BITANCOURT, A. A., JENKINS, A. E., & ROSSETTI, V. — 1954 — Mancha da folha de seringueira causada por *Elsinoë* (Abs.) In Resumos dos trabalhos apresentados. *Congr. Panamer. de Agron.* 2º, Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil, 29 de Março a 6 de Abril, 1954. (multilith) pp. 244-245.
- BURKHOLDER, W. H. — 1917 — The anthracnose disease of the raspberry and related plants. *N. Y. Cornell Agr. Exp. Sta. Bull.* 395, p. 155-183.

- COX, R. S. — 1954 — Some common diseases of flowering dogwood in Delaware. *Agr. Exp. Sta. Univ. Del. Circ.* 27, 8p.
- JENKINS, A. E. — 1931 — Development of the citrus-scab organism. *Jour. Agr. Res.* 42: 545-558.
- JENKINS, A. E. — 1932 — Rose anthracnose caused by *Sphaceloma*. *Jour. Agr. Res.* 45: 321-337.
- JENKINS, A. E. — 1936 — Comparações culturaes e inoculações em videira com os fungos "*Elsinoë fawcetti*", "*E. ampelina*" e "*E. veneta*". *Arq. Inst. Biol.* São Paulo. 7: 23-32.
- JENKINS, A. E. — 1945 — Scab of *Cinchona* in South America caused by *Elsinoë*. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 35: 344-352.
- JENKINS, A. E. — 1947a — A specific term for diseases caused by *Elsinoë* and *Sphaceloma*. *Plant. Dis. Rept.* 31: 71.
- JENKINS, A. E. — 1947b — Spot anthracnoses. *U. S. Dept. Agr. Yrb.* 1943/47: 451-454.
- JENKINS, A. E. — 1956 — Presença de *Dothidella ulei*, *Catacauma huberi* e "perfurações da folha" em espécimens de herbarios fanerogâmicos. *Biológico* 22: 69-70.
- JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1939 — Ilustrações das doenças causadas por "*Elsinoë*" e "*Sphaceloma*" conhecidas na America do Sul até Janeiro de 1936. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 10: 31-60.
- JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1941 — Revised descriptions of the genera *Elsinoë* and *Sphaceloma*. *Mycologia* 33: 338-340.
- JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1943 — Gouirand and Bergeron's treatment of *Sphaceloma ampelinum*. *Mycologia* 35: 272-276.
- JENKINS, A. E., BITANCOURT, A. A., & ROSSETTI, V. — 1954 — Uma antracnose maculada da seringueira. *Biológico* 20: 107-109.
- JENKINS, A. E., & MASSEY, L. M. — 1938 — Rose anthracnose. *Amer. Rose Ann.* 1938: 136-141.
- JENKINS, A. E., & UKKELBERG, H. G. — 1935 — Scab of goldenrod caused by *Elsinoë*. *Jour. Agr. Res.* 51: 515-525.
- LANGFORD, M. H. — 1945 — South American leaf blight of Hevea rubbertrees. *U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.* 882, 31 p.
- LA RUE, C. D. — 1926 — The Hevea rubber tree in the Amazon Valley. *U. S. Dept. Agr. Dept. Bull.* 1422, 70 p.
- MASSEY, CYNTHIA W. — 1952 — The anthracnose disease of roses. *Amer. Rose Ann.* 1952: 198-207.
- PAX, F. — 1896 — Euphorbiaceae. In Engler, A., e Prantl, K. Die Natürlichen Pflanzenfamilien t. 3(5) p. 1-119. Leipzig.
- PHILLIPS, A. M., COLE, J. R., & LARGE, L. R. — 1952 — Insects and diseases of the pecan in Florida. *Univ. Fla. Exp. Stas.*, in cooperation with the *U. S. Dept. Agr. Bull.* 499 (Revision of Bull. 411). 76 p.
- RACIBORSKI, M. — 1900 — Parasitische Algen und Pilze Javas. t. 1, 39 p. Batavia.
- RANDS, R. D. — 1924 — South American leaf disease of Para rubber. *U. S. Dept. Agr. Dept. Bull.* 1286, 19 p.
- RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature. 43 p. Washington, D. C.

- WALLACE, G. B., JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1955 — Estudos sobre as Mirianguales VI. Verrugose do mamoeiro, causada por *Sphaceloma*. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo. 22: 79-86.
- WEBER, G. F. — 1952 — *Elsinoë corni* Jenkins & Bitanc., on flowering dogwood in Gainesville, Florida. *Plant. Dis. Rept.* 36: 294-295.
- WEIR, J. R. — 1926 — A pathological survey of the Pará rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the Amazon Valley. *U. S. Dept. Agr. Bull.* 1380, 130 p.
- WINSTON, J. R. — 1923 — Citrus scab: its cause and control. *U. S. Dept. Agr. Bull.* 1118, 39 p.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 11

- Figs. A-C — A e B — Parte dos dois primeiros espécimens de antracnose maculada da seringueira, do litoral de São Paulo. A, face superior de um folíolo, de Ubatuba, Outubro de 1951 (IB 5785), x 1. B, detalhe de A, x 5. C, parte da face inferior de um folíolo, de Caraguatatuba, 18 de Dezembro de 1953 (IB 6118), x 5. (A figura A, juntamente com outros folíolos do mesmo espécimen, assim como uma área mais extensa do folíolo mostrado em B, foram publicados alhures (JENKINS, BITANCOURT e ROSSETTI 1954).
- Figs. D-F — Frutificações de *Elsinoë heveae*, vistas em secções transversais de lesões de antracnose maculada. D, dois acérvulos de um cancro peciolar (IB 6550); E, um ascoma em mancha da fôlha (IB 6118); F, forma conidiana que se desenvolveu numa fôlha inoculada (IB 6243). Tôdas x 500.
- Fig. G — Infecção abundante em fôlha inoculada com uma cultura de *E. heveae* em 29 de Janeiro de 1954, face inferior da fôlha, x 5.
- Figs. H-K — Culturas de *E. heveae* em meio batata-dextrose-agar. H e I, de duas semanas, em tubos; H, isolamento monoascospórico (cultura 944 F). I, reisolamento original de uma fôlha inoculada, experiência de 29 de Janeiro de 1954; J e K, depois de um mês a 24°C, em caixa de Petri. J, cultura monoascospórica (944 F); K, cultura de tecido (942 F). x 1.

Fot. W. Rodrigues (A-C, G-K) e A. A. Bitancourt (D-F)

Estampa 12

- Figs. A-G — Manchas das fôlhas (A-C, G) e cancos do pecíolo (D) e haste (E e F) da antracnose da seringueira. Espécimens de Caraguatatuba. A, de IB 6118, face superior, x 2/3; B-F, de IB 6281, B, face inferior e C, face superior, da mesma fôlha, x 2/3; D e E, x 1; F, detalhe de E, x 5; G, detalhe de A, com ascomas visíveis como pontuações escuras sobre as partes claras das lesões, x 5.
- Fig. H — Ascoma de *Elsinoë* em secção transversal, do mesmo ascoma da estampa 11, E, x 500.
- Figs. I e J — Fôlha de um pequeno pé de seringueira de Belterra (IB 6508) fortemente atacado de antracnose maculada. I, face inferior de uma fôlha inteira, x 1; J, detalhe de I, x 5.

Fot. W. Rodrigues (A-G, I-J) e A. A. Bitancourt (H)

Estampa 13

Figs. A-D — Lesões de queima da fôlha em fôlhas novas de seringueira vendo-se numerosos picnidios. Especimen de Paramaribo, Guiana Holandesa, 30 de Agosto de 1939. Col. e com. G. Stahel. A, face superior, de dois folíolos, x 1; B, face inferior de parte dos mesmos folíolos, x 1; C, face superior de parte de dois outros folíolos; D, aspecto dos picnidios em torno das lesões, x 5.

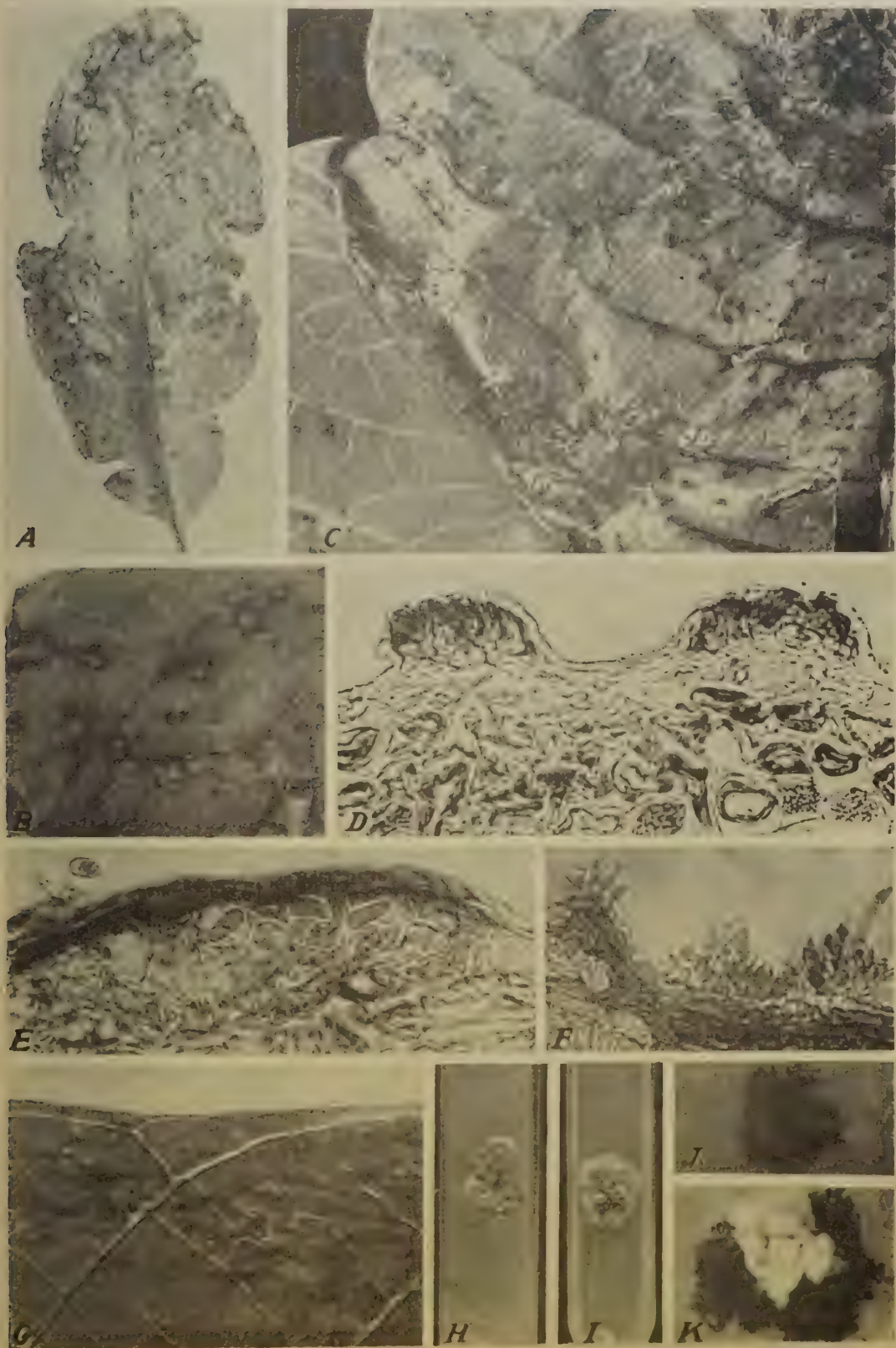
Fot. W. Rodrigues

Estampa 14

Figs. A-F — Culturas em meio de batata-dextrose-agar inclinado, de *Elsinoë heveae*, cepa 942 F, mantida durante 4 semanas nas temperaturas indicadas: Tôdas x 1. A, Estirpe convoluta (942 Fc); B, Estirpe pulvinada (942 Fp); C e D, dois outros tubos das duas estirpes nas temperaturas de 30 e 33°C, da comparação representada em A e B. E e F, culturas de uma série de comparações paralelas de culturas oriundas dos dois sectores indicados por *a* e *b*, em D. E, 3 repicagens de D, *a*, a 24°C e a 33°C. F, repicagens correspondentes de D, *b*. Informações mais detalhadas no texto.

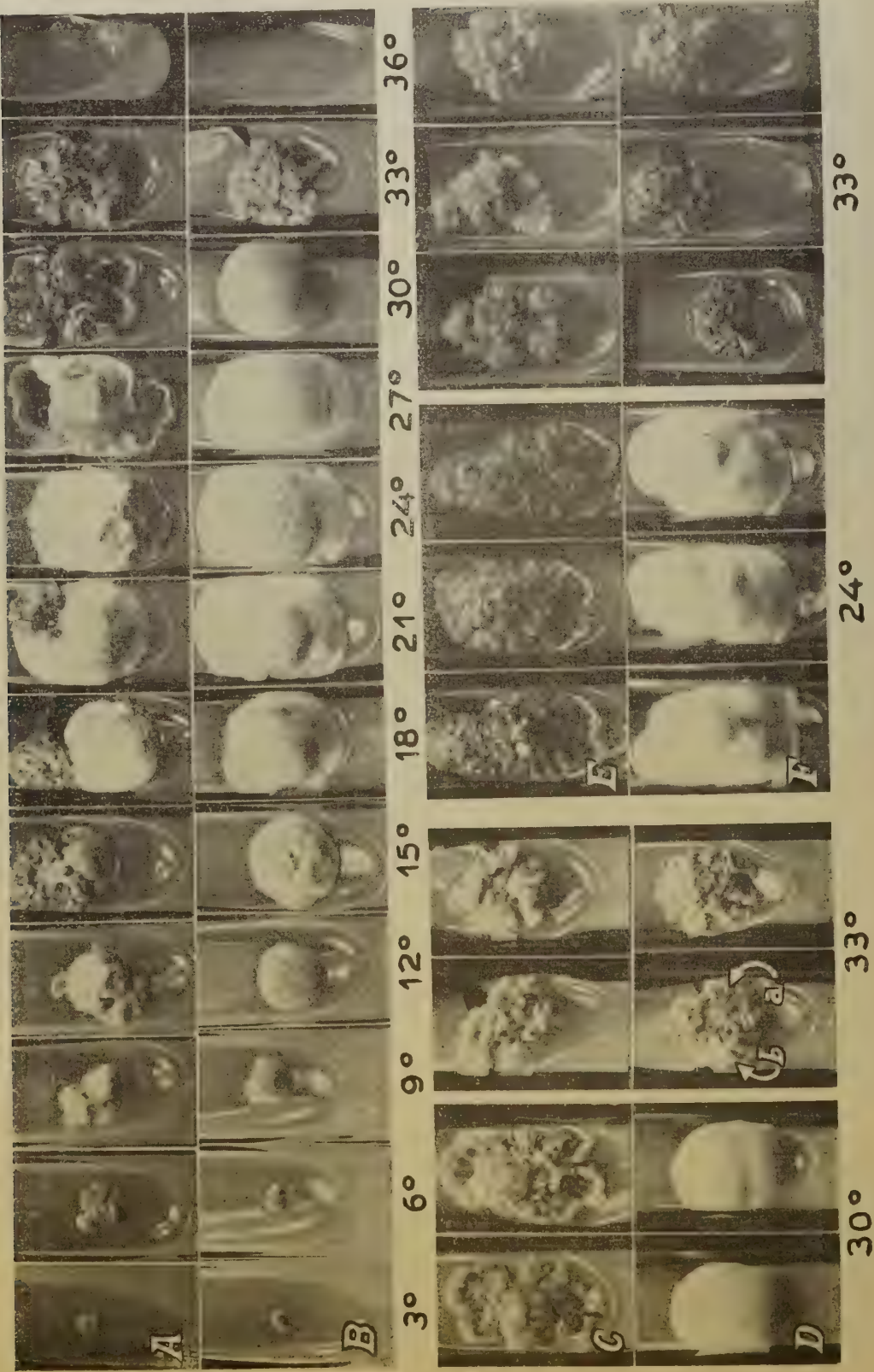
Fot. A. A. Bitancourt e W. Rodrigues











EMPRÊGO DO LEITE NA EXECUÇÃO DA PROVA DA FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE CASTAÑEDA PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA

POR

Ayamá D. Caldas e Leão J. P. Machado

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Em trabalhos anteriores (1, 2) fizemos um estudo do método de CASTAÑEDA, denominado fixação em superfície (surface fixation), empregado para o diagnóstico da brucelose no homem e nos animais (3, 4). Esta prova tem sido utilizada empregando-se exclusivamente o sêro sanguíneo. Resolvemos, então, dada a presença quase constante de anti-corpos de *Brucella* no leite de vacas infectadas, verificar a possibilidade do emprêgo do leite em vez do sêro sanguíneo, na execução da prova de CASTAÑEDA, para o diagnostico da brucelose bovina a semelhança do "ring test".

MATERIAL E MÉTODOS

Tivemos a oportunidade de estudar em um sítio próximo a S. Paulo vários casos de brucelose bovina. Trazíamos ao laboratório 10 ml de sangue de cada vaca, colhidos por punção venosa em tubos de ensaio. Após a coagulação, o sêro sanguíneo era centrifugado e submetido às provas de fixação em superfície (1, 2, 3 e 4) e sêro aglutinação lenta (5). Ao mesmo tempo que colhíamos as amostras de sangue, de cada animal, com os cuidados de assepsia, ordenhávamos cerca de 40 ml de leite, 10 ml de cada teta. As amostras de leite trazidas em gelo, uma vez no laboratório eram submetidas simultaneamente as provas do "ring test" segundo a técnica usual, utilizando-se antígeno corado pelo tetrazólio, e, à prova da fixação em superfície segundo a seguinte *técnica*:

Tomam-se 5 ml de cada amostra de leite após perfeita agitação, centrifuga-se (2.000 r. p. m.), quinze minutos em tubo de 0,5 cm de diâmetro. Em seguida com uma serrinha corta-se o tubo um pouco abaixo da linha de creme, dividindo-o em duas partes a fim de separar completamente o leite desnatado da gordura a qual é descartada. Esta operação é de suma importância, pois uma minima quantidade de creme, prejudicará sensivelmente a prova. Nestas condições o leite desnatado, contido na parte inferior do tubo cortado,

é utilizado para execução da fixação em superfície, segundo a técnica descrita (1, 3, 4), empregando-se o leite desnatado em vez do sôro sanguíneo.

RESULTADOS

Inicialmente, tentamos executar a prova da fixação em superfície, com amostras de leite integral, isto é, “in natura”, colhidas de 14 vacas de um sítio onde havia um surto de brucelose. Nestas condições executamos a prova de CASTAÑEDA utilizando uma gota de leite integral ao invés de sôro sanguíneo, seguindo então a técnica já descrita. (1, 3 e 4). Os resultados estão expressos na tabela I.

TABELA I

Prova da fixação em superfície realizada com 14 amostras de leite “in natura”

Amostras n.	Fixação em superfície
1 a 14	todas 100% positivas

Verifica-se por esta tabela que a prova da fixação em superfície realizada com leite integral dá em todos os casos resultados positivos (100% de fixação).

Em virtude desta primeira experiência ter dado resultados insatisfatórios resolvemos centrifugar as mesmas amostras de leite, pois provavelmente a gordura seria a responsável pela positividade absoluta da reação. Realmente foi o que sucedeu conforme verifica-se pelos resultados da segunda série de experiências sumarizados na tabela II, quando se empregou as amostras de leite depois de desnatadas, seguindo-se a técnica descrita no início deste trabalho.

Pelo exame da tabela II verifica-se que a prova da fixação em superfície realizada com leite desnatado acompanhou os resultados da hemo sôro aglutinação e os da fixação em superfície no sôro sanguíneo, havendo porem discrepância quando o leite está sob a forma de colostro. A prova neste caso dá resultados positivos à semelhança do “ring test” que também deu resultados positivos com o colostro. Verifica-se também que em 3 casos (vacas de numeros 1, 3 e 13) a prova da fixação em superfície realizada no leite desnatado revelou ser mais sensível que o “ring test”.

TABELA II

Prova da fixação em superfície em 14 vacas, realizada com o sêro sanguíneo e leite desnatado comparada com a hemo sêro aglutinação lenta e o “ring test” do leite

Vaca N.º	Aglutinação lenta Sêro sanguíneo título	Ring test Leite	Fixação em superfície	
			Sêro sanguíneo	Leite desnatado
1	1:25	—	25%	25%
2	—	—	0%	0%
3	1:50	—	50%	50%
4	1:400	+++	100%	100%
5	1:12,5	+++	50%	100%
6	1:25	++	25%	50%
7	1:400	+(colostro)	100%	100% (colostro)
8	—	—	0%	0%
9	—	++ (colostro)	0%	50% (colostro)
10	—	—	0%	0%
11	—	+(colostro)	0%	100% (colostro)
12	—	—	0%	0%
13	1:200	—	100%	25%
14	1:800	+++	100%	100%

DISCUSSÃO

A primeira observação interessante é a interferência da gordura no resultado da prova da fixação em superfície. O leite integral não se presta para a execução da prova em virtude da presença do creme pois sistematicamente dá resultados positivos. Outra observação é a da interferência do colostro. Os leites colostrais também dão resultados positivos à semelhança do “ring test”. A interferência do colostro e também da gordura explica-se, provavelmente, pela formação de um “filme” envolvendo a mancha do antígeno no papel impedindo assim a difusão do corante. Exceptuando esta discrepância (referente aos leites colostrais) verifica-se que a prova de CASTAÑEDA executada com leite desnatado acompanhou perfeitamente os resultados obtidos com essa mesma prova realizada no sêro sanguíneo e os resultados da hemo sêro aglutinação. Revelou-se mesmo, mais sensível que o “ring test” em demonstrar as aglutininas de *Brucella*. Os resultados falsos obtidos com leite colostrais podem ser contornados do mesmo modo que no caso do “ring-test”, isto é, colhendo-se novas amostras, alguns dias depois, quando houver o desaparecimento do colostro.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os autores estudaram a possibilidade de aplicar a prova da fixação em superfície de CASTAÑEDA no diagnóstico da brucelose bovina empregando o leite ao invés do sêro sanguíneo, obtendo as seguintes conclusões:

1. — Leite integral, “in natura”, não se presta para a execução da prova pela interferência da gordura — os resultados obtidos são invariavelmente positivos.

2. — Leite desnatado, segundo a técnica descrita no texto, dá resultados plenamente satisfatórios acompanhando mesmo os obtidos com o sêro aglutinação lenta e a fixação em superfície, efetuadas com o sêro sanguíneo de vacas infectadas e livres de brucelose.

3. — Para se ter resultados seguros, com esta técnica de leite desnatado, é de suma importância que não fique o menor traço de gordura no leite desnatado. Em caso contrario corre-se o risco de se obter falsos resultados positivos.

4. — A prova revelou-se mais sensível que o “ring test” em demonstrar as aglutininas de *Brucella* no leite.

5. — Leite colostrado, mesmo desnatado, dá resultados invariavelmente positivos à semelhança do que ocorre com o “ring test”.

SURFACE FIXATION METHOD OF CASTAÑEDA, USING THE MILK, FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS

A b s t r a c t

The AA studied the possibility of the application of the surface fixation test of CASTAÑEDA, for the diagnosis of bovine brucellosis, using the milk instead of blood serum and the following conclusions were obtained:

1. — *Whole milk failed to give satisfactory results, because systematically was obtained 100% of fixation. These constant false positive results with whole milk are caused by the cream interference, probably by forming a film of fat involving the antigen spot in the CASTAÑEDA paper, thus avoiding the diffusion of the stain.*

2. — *Skim milk, obtained by centrifugation, gave quite satisfactory results as comparing with the tube agglutination and surface fixation tests performed with blood serum of cows infected and free of brucellosis.*

3. — *To obtain safe results with this skim milk technique without any cause of error, it is necessary that not even a trail of fat remains in the milk, because in that case it is possible obtaining positive false results.*

4. — *This surface fixation test performed with skim milk showed to be more efficient in detecting the Brucella agglutinins of the milk, as comparing with the ring test.*

5. — *The only discrepancy with this skim milk technique was observed in the cases of the colostrum milks, in which constant positive results were obtained. Like in the case of the ring test, in which positive results are also obtained with the colostrum milks, it is necessary wait a few days until the colostrum disappears, to collecting new samples. These false positive results like in the whole milk, are probably caused also by the formation of a film involving the antigen spot.*

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CALDAS, A. D.; PLANET, N. G.; MACHADO, LEÃO J. P., — 1955 — *Arq. Inst. Biol.*, vol. 22: 87-92.
 - 2 — CALDAS, A. D. e MACHADO, L. J. P., — 1955 — *Arq. Inst. Biol.* vol. 22. 243-247.
 - 3 — CASTAÑEDA, M. R., — 1950 — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, vol. 73: 46.
 - 4 — CASTAÑEDA, M. R. — 1953 — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, vol. 83: 36.
 - 5 — AMARAL, J. P.; TAUNAY, A. E.; NOVAES, J. R. C.; PLANET, N. G. e ESTEVES, M. B. — 1953 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, vol. 13: 169.
-

RETRAÇÃO POR CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DO COAGULO DE PLASMA DE GALINHA

POR

Maria Pereira de Castro

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com a estampa 15

INTRODUÇÃO

Muitas vezes é preferível preparar soro a partir de plasma coagulado. O aproveitamento da mesma operação para a obtenção de soro e plasma, quando não foram calculadas de antemão as proporções de um e de outro, seria um dos casos. Prepara-se tudo como plasma que é armazenado. O soro vai sendo obtido à medida das necessidades. Poderíamos também precisar de soro isento de qualquer hemolise, que, seria mais interessante obter a partir de plasma.

A obtenção de soro de mamíferos, em geral, a partir de plasma coagulado, é mais simples. Geralmente o coagulo é pouco firme; basta descolá-lo do recipiente, dilacerá-lo com a pipeta e centrifugá-lo, para se obter bom rendimento de soro.

O caso se complica para a obtenção de soro de galinha. O coagulo aqui é firme, não podendo ser dilacerado facilmente. É necessário triturá-lo em areia esteril ou centrifugá-lo através de perolas de vidro e areia estereis, segundo o metodo de LINDBERG (9).

Neste trabalho apresentamos um metodo, que, além de ser mais simples do que os usados até aqui, parece-nos obedecer a um princípio que pode ter algum valor na explicação do mecanismo da retração de rede de fibrina.

Queremos deixar nossos agradecimentos a C. PEREIRA pela orientação e conselhos e a J. REIS pela leitura dos originais.

MATERIAL E TECNICA

No início usamos tubos de plasma de galinha, coagulados acidentalmente, e depois plasma coagulado com 1 a 2 gotas de extrato de embrião. O plasma foi obtido pela técnica de DELEZENNE (5), modificada por BORDET & GENGOU (3). Os tubos usados mediam 18×100 mm, eram silicionados ou parafinados e continham de 2 a 4 ml de plasma. Depois de coagulado o plasma era colocado a -15°C , para congelar. Em seguida era descongelado sob agua de torneira, ou simplesmente deixado em geladeira comum. Para o estudo da

estrutura da rede de fibrina os coágulos, retraído e não retraído, foram fixados em sublimado-formol, incluídos em parafina, cortados a 4 micra de espessura e corados pela hematoxilina ferrea.

RESULTADOS

Obtivemos rendimento de 80 a 85 por cento de soro. Há nitida diferença de estrutura entre o coágulo não retraído e o que sofreu retração pelo processo do congelamento e descongelamento. A estrutura do coágulo não retraído é, guardadas as proporções, comparável à que VAN ZANDT & PORTER (14) obtiveram em microscopia eletrônica. A estrutura do coágulo artificialmente retraído é lacunosa, sendo as lacunas limitadas por paredes formadas por rede de fibrina mais densa do que no coágulo não retraído (Est. 15, figs. A e B).

DISCUSSÃO

Os autores, em geral, se acordam sobre o papel das plaquetas na retração do coágulo. Ficou demonstrada a proporcionalidade entre o número de plaquetas e a porcentagem de retração (16, 6). Por outro lado, entre a porcentagem de retração e o teor de fibrinogênio há proporção inversa (12). A concentração ótima de fibrinogênio foi estimada em 100 mg por cento (10).

O plasma de galinha é dos mais ricos em fibrinogênio. Além disso, os trombócitos das aves são verdadeiras células e muito mais pesadas do que as plaquetas dos mamíferos; por isso seriam separadas do plasma durante a centrifugação comum para a separação dos glóbulos vermelhos, resultando um plasma senão desprovido, pelo menos muito pobre em trombócitos.

Esses dois fatores — riqueza em fibrinogênio — escassez de trombócitos — concorreriam para a dificuldade de retração que apresenta o coágulo de plasma aviário.

O mecanismo mesmo da retração do coágulo permanece ainda obscuro. Fonio (7) acredita ter separado pela desintegração ultrassônica, duas frações de plaquetas. Uma, correspondente ao grânulo, responsável pela coagulação do sangue e outra, correspondente ao hialômero, responsável pela retração do coágulo. Esta explicação choca-se porém, com os experimentos de ROVATTI (13), que ao destruir as plaquetas pelo mesmo processo, diminuía o poder de retração do coágulo. BUDTZ-OLSEN (4) defende a hipótese de que as plaquetas desempenham atividade vital; o encolhimento da fibrina seria devido a contração dos pseudópodos das plaquetas aderidas à fibrina ou à outra plaqueta aglutinada. Parece confirmar essa supo-

sição a observação por alguns autores (1, 15, 8) de que certos fatores físicos, como por exemplo o congelamento do plasma impede a posterior retração do coagulo. HARTMANN & CONLEY (8) verificaram ainda, que se o congelamento for posterior à coagulação não interferirá com a sinérese. Isto aconteceria porque o congelamento e o degelo sucessivos lisam as plaquetas (6); mas, quando esta lise é posterior à coagulação, não interfere com a retração normal.

Segundo nossa experiência, tanto o coagulo de plasma aviário como de mamífero retraem bem pelo descongelamento. Tivemos ocasião de verificar sensível aumento de retração para o plasma de coelho. E, o coagulo de plasma aviário, que nas condições normais tem retração quasi nula, sofre retração de 80 a 85 por cento. Tudo isso leva-nos a supor que, pelo menos em parte, a retração dependa da existência de particulas intimamente ligadas à rede de fibrina, e que com a desintegração, ou, em nosso caso particular, com a fusão das particulas de gelo, provocariam o encolhimento da fibrina. Se HARTMANN & CONLEY (8) explicaram que o congelamento anterior à coagulação impede a retração devido à destruição das plaquetas, mas não puderam entretanto explicar porque o congelamento posterior à coagulação não a impede, é porque trabalharam com plasma rico em plaquetas. Como este plasma se contraia normalmente, eles não tiveram sua atenção chamada para o papel das particulas de gelo na retração da rede de fibrina. ELLICOTT & CONLEY (6) demonstraram, no entanto, que plaquetas lavadas não são suficientes para provocar a retração do coagulo formado por fibrinogenio e trombina, sendo necessário a adição de sôro. Têm também o mesmo efeito a fração albumina do soro, além de substâncias como a goma arábica e a albumina de ovo. Eles acreditam ser importantes a presença de particulas coloidais liofilas, pois particulas inertes, como carvão e vidro em pó, não tiveram nenhuma interferência na retração normal. Isso parece confirmar nossa hipotese de que não basta a presença de particulas; estas deverão estar intimamente ligadas à rede de fibrina e deverão ser desintegraveis como acontece com as plaquetas e com as particulas de gelo.

RETRACTION OF CHICKEN PLASMA CLOT BY FREEZING AND THAWING

A b s t r a c t

A simple method for obtaining chicken serum by freezing (about -15°) and thawing of the clotted plasma in silicone or paraffine treated tubes is presented.

The chicken clotted plasma which in normal conditions does not retract, yields by this process about 85 per cent of serum.

It is well known that a plasma clot can't retract without platelets. In the case of the avian plasma, two factors contribute to the unretractility of its clot: the almost complete absence of thrombocytes and the high rate of fibrinogen.

It is possible that the minute crystals of ice may have a function similar to that of the platelets, viz, a purely mechanical function. The platelets as well as the particles of ice would disintegrate and promote the shrinkage of the fibrin.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTHUS, M. & CHAPIRO, T. — 1908 — Etudes sur la rétraction du caillot sanguin. *Arch. Intern. Physiol.* 6: 298-305. *Apud* Biggs & Macfarlane (2).
2. BIGGS, R. & MACFARLANE, R. G. — 1953 — Blood coagulation and its disorders. Blackwell, Oxford, 1953.
3. BORDET, J. & GENGOU, O. — 1901 — Recherches sur la coagulation du sang et les sérums anticoagulants. *Ann. Inst. Pasteur* 15: 129-44.
4. BUDTZ-OLSEN, O. E. — 1951 — Clot retraction. Blackwell, Oxford. *Apud* Biggs & Macfarlane (2).
5. DELEZENNE, C. — 1897 — Recherches sur la coagulation du sang sur les oiseaux. *Arch. Physiol. Normal et Path.* 5: 333-47.
6. ELLICOTT, C. E. & CONLEY, C. L. — 1951 — Retraction of clots formed from purified fibrinogen. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 88: 321-31.
7. FONIO, A. — 1951 — Ueber das funktionelle Verhalten der isolierten Strukturelemente der Thrombocyten, des Hyalomers und der Granulomers. *Acta Haemat.* 6: 207-12. *Apud* Biggs & Macfarlane (2).
8. HARTMANN, R. C. & CONLEY, C. L. — 1953 — Clot retraction as a measure of platelets function. 1 — Effects of certain experimental conditions on platelets in vitro. *Bull. John Hopkins Hosp.* 93: 355-69.
9. LINDBERG, C. A. *in*: PARKER, R. C. — 1950 — Methods of tissue culture 2^o Ed. Paul B. Hoeber, New York.
10. LUNDSTEEN, E. — 1942 — On the clot retraction of the blood. *Acta Med. Scand.* 112: 302. *Apud* Hartmann & Conley (8).
11. MACFARLANE, R. G. — 1938 — The normal haemostatic mechanism and its failure in the haemorrhagic states. Thesis for the degree of Doctor of Medicine in the University of London. *Apud* Biggs & Macfarlane (2).
12. QUICK, A. J. & HUSSEY, C. V. — 1950 — The mechanism of clot retraction. *Science* 112: 558-9.
13. ROVATTI, B. — 1950 — Modificazioni di retrattilità del coagulo da trattamento con ultrasuoni. *Il Sangue* 3. *Apud* Biggs & Macfarlane. (2).

14. VAN ZANDT HAWN, C. & PORTER, K. R. — 1947 — The fine struture of clots formed from purified bovine fibrinogen and thrombin: a study with the electron microscope. *J. Exp. Med.* 86: 285-92.
15. WERNER, H. — 1943 — Die Spontanretraktion des Blutkuchens. *Deut. Arch. Klinische Medizin* 190: 391. *Apud* Biggs & Macfarlane (2).
16. WERNER, H. — 1943 — Die spontan Retraktion des Blutkuchens. *Klin. Woch.* 22: 414-6.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 15

Fig. A — Estrutura do coagulo de plasma de galinha retraído artificialmente.
 Fig. B — Estrutura do mesmo coagulo não retraído.

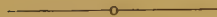
NOTA

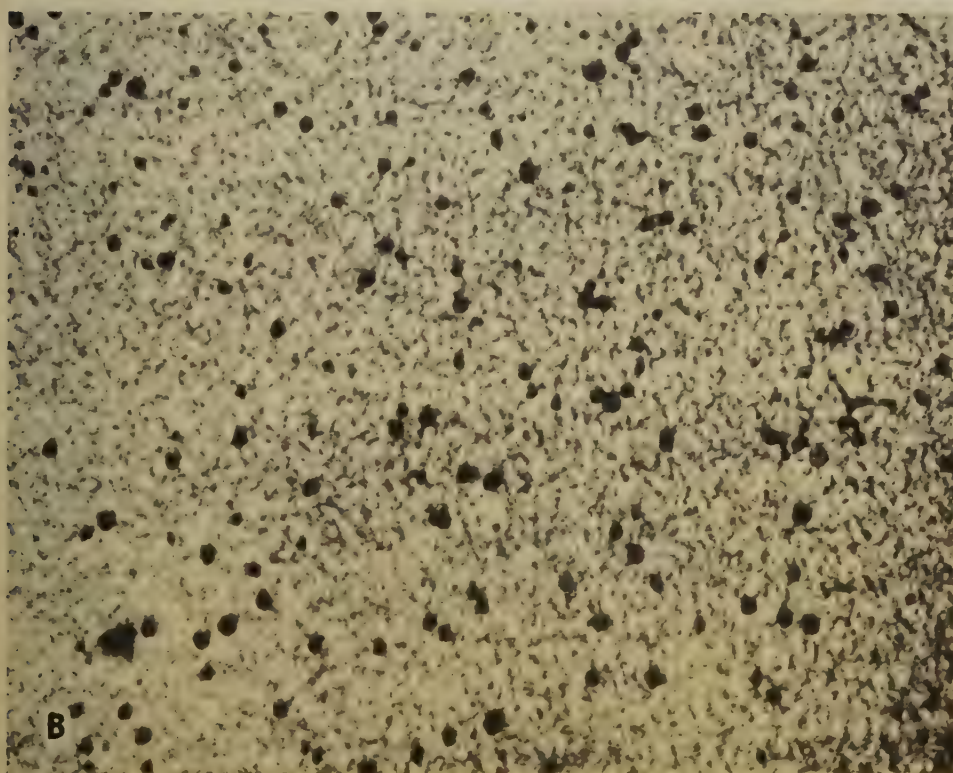
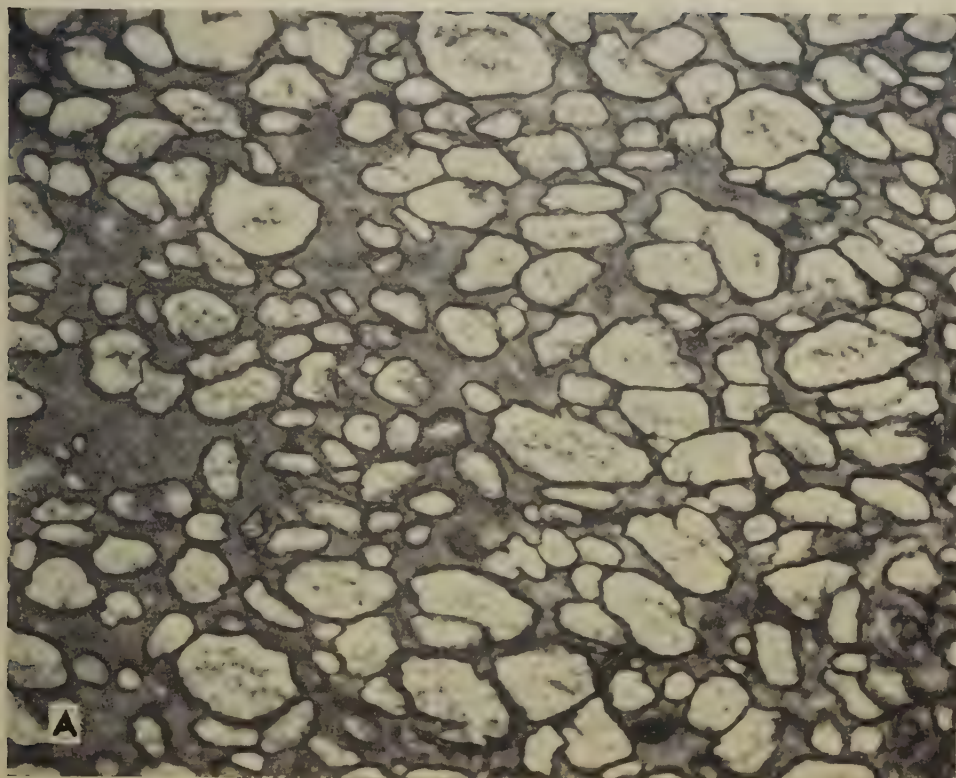
Quando este artigo já estava na segunda prova, chegou-nos às mãos o artigo de S. I. Magalini e M. Stefanini publicado na revista Science, volume 123 de 4 de Maio de 1956, pagina 796.

Nesse artigo os autores demonstram em extratos de plaquetas a existencia de um lipide, a "retractina", que promove a retração do coagulo de plasma desprovido de plaquetas e de coagulo de fibrinogenio bovino purificado.

A "retractina" pode tambem ser isolada de outros tecidos principalmente de cerebro, figado e baço. Não existe em eritrocitos e em plasma desprovido de plaquetas.

Os autores acrescentam ainda que, por experiencias preliminares, a atividade da "retractina" parece depender não só da sua natureza quimica, mas tambem das suas propriedades fisicas.





MÉTODO RAPIDO DE LIBERAÇÃO DA MUCILAGEM DO CAFÉ DESPOLPADO PELA ATIVAÇÃO DE SUAS PROPRIAS ENZIMAS

I — ESTERASES PANCREATICAS E ATIVADORES CATIONICOS NA DESGOMAGEM DO CAFÉ DESPOLPADO

POR

J. Pereira Junior

Do Instituto Biológico de S. Paulo

E' noção corrente que só com a produção de cafés finos poderá o Brasil vencer a concorrência cada vez mais agressiva, desenvolvida nos mercados internacionais de café, por produtores de diferentes areas geográficas, estimulados tanto por fatores políticos, como pela onerosissima e famosa "umbrella" de preços sustentada quasi sempre por este país, com breves interregnos em que a Colombia a sustenta.

E' de interesse lembrar que o problema do café comercialmente bem preparado e de bôa bebida, já vem sendo propugnado no Brasil desde os primordios do Império, onde observações argutas como as de Antonio da Silveira Caldeira (1843), derivadas da experiência cafeeira incipiente aqui, e de observações na Martinica e Antilhas e alhures o levaram a verificar, à página V do prefácio, que: "Tem causado mui graves prejuizos aos lavradores de café no Brasil, e às mesmas rendas nacionaes, nos direitos de exportação, não termos até agora adoptado o verdadeiro metodo de preparação daquele gênero". Após estudar os métodos de colheita, preconisa à pagina 12, um "Novo metodo de preparar o café", baseado no despolpamento do café cereja, consequência de suas observações no Exterior.

Depreende-se da leitura dessa publicação, que, tudo o que se tem publicado posteriormente sobre café, não tem passado, a nosso ver, de um repisar monotono das mesmas observações, por diferentes técnicos, em diferentes épocas sem que nada de novo fosse ajuntado.

Dado que os nossos concorrentes mais fortes o são pela excelência da apresentação comercial e da bebida do seu café, obtida quasi que exclusivamente pelo despolpamento das cerejas, uns poucos lavradores adiantados, entre nós, têm procurado no despolpamento, um meio seguro de obter melhor produto, de preço naturalmente mais elevado.

Para a liberação da pectina (mucilagem) do café despolpado tem sido usada a fermentação desta em estado humido, ou em agua, por (24-48 horas) em tanques diferentes formatos, por bacterias e

cogumelos do ambiente, auxiliada por meios mecanicos, podendo ser acelerada, geralmente, para 12 horas e até mesmo 6 horas, pela adição de fermentos de origem bacteriana, obtidos, ainda hoje, por importação.

Meditando sobre este assunto, pareceu-nos razoavel experimentar-se as esterases, sabidamente pouco específicas (SUMNER e SOMERS, 1943), existentes nas glândulas digestivas de mamiferos, para a desgomagem rápida do café despulpado.

PARTE EXPERIMENTAL

Glândulas salivares e pancreas de 12 ratos adultos, de cêrca de 250 gr. dispensados da criação no Biotério, foram trituradas, separadamente, com areia livre de sais solúveis, e o homogenato de cada grupo de glândulas, foi extraído com solução salina de NaCl a 0,8% e precipitado 2 vezes com acetona, segundo SUMNER e MYRBÄCK, (1950), 1(1) pg. 687.

Essa preparação bruta de fermentos foi extraída no filtro com duas porções de 25 cm³ de eter e secada na estufa a 45-50°C.

Café cereja foi colhido de alguns pés de café (*Coffea arabica* L. var. *Typica*) e da plantação de Bourbon vermelho Mundo Novo, deste Instituto, despulpado manualmente resultando em porções sucessivas de café despulpado, que foram divididos em 5 lotes de 91 g agrupados na Tabela I, e em 3 lotes de 69 g, agrupados na Tabela 2.

Tabela 1

Tabela 1. Na duração arbitrariamente escolhida de 1 hora, o lote 1 nos mostra a pequena atuação do só ativador em presença da acidez natural da mucilagem diluida pela agua, bem como no lote 3, sob a ação da acidez, reforçada por acido cloridrico.

A comparação dos lotes dois e quatro, ao par de nos mostrar a inatividade da amilase salivar, ressalta o papel surpreendente do meio de pH elevado, ativado pelo cloreto de sodio, sobre as esterases naturais da mucilagem (PERRIER, 1931).

Por outro lado o lote cinco evidencia a grande intensidade de ação das esterases pancreativas, ativadas, em meio adequado, na liberação, dentro de 1 hora, de mucilagem do café.

E' de se notar que estas experiências se desenvolvessem em temperatura ambiente e sem que a desgomagem do café fosse, de nenhum modo, auxiliada mecanicamente.

Tabela 2. Como as esterases são ativadas pelos cloretos, mas também pelos anions, crescendo a ativação por estes com o aumento

TABELA 1
AÇÃO DO pH E DA ATIVAÇÃO POR NaCl DAS ENZIMAS DE GLANDULAS SALIVARES E PANCREATICAS SOBRE
A DESGOMAGEM DO CAFE' DESPOLPADO

Café despolpado; 547 g, divididas em 5 cilindros graduados de 500 cm³. Em temperatura ambiente de 19° C. Hidrolise de 1 hora. O conteúdo dos cilindros foi ligeiramente misturado cada 15 minutos. Lavagem dos grãos; seca por 20 horas a 45-50°C.

OBSERVAÇÕES

LOTE	Café despolpado pH 4. G	Meio desgomante em agua corrente para 500 cm ³	Ativador NaCl	ENZIMAS	Uma hora após	Aspecto do Pergaminho após Lavagem	Após 20 horas de seca. Avaliação de opalescen- cia de 20 cm ³ de agua; de 0 a 4; por agitação de 10 gr. de café em pergaminho por 5 mins
1	91	Água pH 5	0,4%	—	Ao fim de 1 hora o café foi separado do líquido, lavado rapida- mente e posto a secar por 20 horas a 45-50°C.	Muito liso. Mucilagem viscosa aderente	3
2	91	Solução de NaHCO ₃ a 1%. pH 9.	0,4%	—		Apenas liso. Leve camada de mucilagem, despregando-se por fricção entre 2 dedos	2
3	91	10 cm ³ de solução de HCl com 31,1 mg de acido — pH 1	0,4%	Extrato bruto de glandula salivar	Após secagem só nos lotes 1 e 3 foram no- tados alguns grupos de 2-4 grãos aderentes.	Muito liso. Mucilagem viscosa aderente	3 1/2
4	91	Solução de NaHCO ₃ a 1%. pH 9	0,4%	Extrato bruto de glandula salivar	Nos lotes 1 a 4, vários grãos aderiram mais ou menos fortemente ao papel de filtro na se- cagem	Apenas liso. Leve camada de mucilagem, despregando-se por fricção	2
5	91	Solução de NaHCO ₃ 1%. pH 9	0,4%	Extrato bruto de pancreas		Aspero. Quasi sem mucilagem. Em alguns grãos resíduos es- cassos de mucilagem despre- gando-se facilmente por fric- ção	1

Por gentileza do Dr. J. Franco do Amaral a quem agradecemos, foi nos fornecido uma amostra de café despolpado, fermentado 12 hrs. por *Clostridium felsenium*. Após secagem, pela agitação em agua, não produziu opalescencia perceptivel de mucilagem.

TABELA 2

AÇÃO DO CÁLCIO E DO CLORETO DE SÓDIO, NA ATIVAÇÃO DAS ENZIMAS SALIVARES E PANCREÁTICAS
SOBRE A DESGOMAGEM DO CAFÉ' DESPOLPADO

Café despolpado 207 g, divididos em 3 cilindros de 500 cm³. Temperatura ambiente de 10°C

OBSERVAÇÕES

LOTE	Café despolpado gr.	Meio desgomante solução de CaOH_2 1% para 500 cm ³	Ativador NaCl	Enzimas de glândulas salivares e de pancreas de ratos	Uma hora após	Aspecto do pergaminho após lavagem
1	69	pH 10	0,4%	—	O café foi lavado rapidamente em água corrente e posto a secar por 20 hrs. a 45-50°C. Não foram notados grãos aderentes entre si após a secagem. Contudo, nos lotes 1 e 3, alguns grãos aderiram ligeiramente ao papel de filtro.	Aspero. Resíduo de mucilagem quasi impalpável
2	69	pH 10	0,4%	Extrato bruto de pancreas de rato	Pergaminhos de cor creme mais clara que nos lotes da tabela 1	Aspero. Sem resíduo de mucilagem
3	69	pH 10	0,4%	Extrato bruto de glândula salivar de rato		Aspero. Resíduo de mucilagem quasi impalpável

do número da valencias (SUMNER e MYRBÄCK, 1950, 1(1) pg. 760), experimentámos a cal virgem comercial, queimando-a, filtrando-se o líquido para obtenção de solução a cerca de 1% de hidróxido de cálcio. O cloreto de sódio foi mantido a 0,4%, conquanto se espere que se estabeleça um equilíbrio CaCl_2 e NaCl , nos 3 lotes; os fermentos pancreáticos e salivares, foram adicionados nos lotes 2 e 3. A temperatura ambiente era de 19°C.

Tabela 2

Observa-se nesta tabela que o efeito da alcalinidade e ativação pelo NaCl , já nitidos na tabela 1, tornou-se tão acentuado sob hidróxido de cálcio que o lote 1 da tabela 2, sem adição de enzimas funcionou quasi tão bem e conseguiu retirar a mucilagem com velocidade comparável à do lote 2 com adição de pancreas. O lote 3, sob adição de glândula salivar, já verificada ser inativa, desgomou comparavel ao lote 1 sem adição de fermentos. O Ca trouxe, como era de se esperar (SUMNER e MYRBÄCK, 1950 1(1) pg. 332), uma ativação maior das próprias enzimas hidrolisantes presentes na mucilagem do café — metil-esterases e poligalacturonidas — de tal modo que não houve sobra sensível de mucilagem em café de nenhum dos lotes, excluída, aqui também, qualquer ação mecânica, ou de temperatura elevada.

A adição, pois, das esterases pancreáticas tornou-se, aqui, do ponto de vista utilitário, superflua para a desgomagem do café, em presença do cálcio. Em publicações subsequentes procuraremos estudar a ativação destas enzimas sob o ponto de vista de atividade e provas de bebida.

DISCUSSÃO

O café de fino paladar foi sempre preparado por despolpamento, segundo referências de CALDEIRA (1843) que aqui propôs método por ele observado nas Antilhas para despolpamento, onde a adição de cinzas ou cal ao banho de desgomagem permitia obter mais rapidamente a limpeza do café em pergaminho, em lugar de amontoá-lo como já se fazia na época, cerca de 12 ou mais horas, para que a mucilagem fermentasse espontaneamente. De fato, o complexo de sais alcalinos das cinzas vegetais ou o alcali da cal, podem provocar a degradação da pectina, mormente si for auxiliada pela ação mecânica, continua ou intermitente por 6 a 12 horas. A adição de sais é, hoje, pouco usada, pela possibilidade de piorar a bebida.

O interesse da liberação, o mais rápido possível, da mucilagem da polpa do café maduro, reside na facilidade com que este hidrato

de carbono, formado pela polimerização de moléculas de ácido galacturônico (HINTON, 1940), pôde em conjunção com os açúcares aí presentes, e que vão a 12 por cento ou mais (PERRIER, 1932), sofrer fermentação por uma série de bactérias e fungos, verificados, no Instituto Agrônomo de Campinas, por LILIENFELD-TOAL (1932), entre os quais predominam levedos selvagens, *Monilia candida*, *Saccharomyces Ludwigii*, além das bactérias, *B. coli*, *B. Lactis-aerogenes*, *B. xilinum*, *B. vulgaris*, entre outras. Este autor verificou que a fermentação bacteriana desenvolve, em poucas horas, grande produção de ácidos orgânicos que além de acidez, têm odores que se sabe, de há muito, poderem se transmitir aos grãos.

Estas fermentações que começam logo que a casca do fruto seja ferida por ruptura ou perfurações de insetos (KRUG, 1940 — a, b, c; 1941 e 1949), acarretam depreciação do café com a contaminação do grão pelo gosto “duro” “riado”, “Rio”, dos classificadores de café.

Todo o café maduro, em “cereja”, dá boa bebida, como observado por CALDEIRA (1843), e confirmado ainda recentemente por CAMARGO (1949) e por KRUG (1949), com cerejas de diversos pontos deste Estado, enquanto o café de varrição dá sempre a pior bebida.

Além do mais, a fermentação espontânea do café despulpado é uma operação de riscos imprevisíveis e que causou decepções, no passado, a cafeicultores deste Estado, pois a micro-flóra não é igual por toda a parte, tendo mesmo PERRIER (1932-a) demonstrado em Campinas que o café cereja despulpado mecânicamente dá o melhor aspecto de grão e a bebida mais fina. Já as amostras do mesmo lote de despulpados, submetidas a fermentações de 6 a 54 horas aparecem com odor e bebida progressivamente inferiores, tanto mais, quanto este tempo se afasta do limite de 6 horas.

E’ evidente, pois, que a rapidez na desgomagem do café é a a melhor garantia de boa bebida do café em qualquer zona do Estado.

Das nossas experiências reunidas nas tabelas 1 e 2, verifica-se que, no espaço, escolhido arbitrariamente, de 1 hora, a simples alteração do pH do meio, em temperatura ambiente, sem auxílio mecânico, pouco resultado produziu sob alcalinização por bicarbonato de sódio, enquanto que melhores resultados se evidenciam pela alcalinização por hidróxido de cálcio.

Já o uso da ativação pelo NaCl, em concentração baixa, mas ótimas para a ativação das esterases pancreáticas, em meio alcalino, mostrou que este ativador, nestas condições de temperatura, pôde ativar as esterases (pectinases, antigas) que por si, especialmente

sob cálcio, podem produzir a limpeza completa da mucilagem do café despolpado.

Ressalta da análise dessas tabelas que nas condições de pH do meio sob ativação de NaCl, nenhum fermento extranho é necessário adicionar à polpa do café maduro; aí estão presentes fermentos, que, convenientemente ativados podem liberar a mucilagem do grão de café, em temperatura ambiente, dentro de 1 hora.

Este fato contrasta com os achados de PERRIER (1931), que colocava o ótimo de atividade da pectinase do café despolpado a 43°C, sob antissepticos, admitindo que as fermentações bacterianas e micóticas teriam o papel secundário de, pela elevação de temperatura do café em fermentação, trazer as enzimas da polpa à temperatura ótima de atividade.

Com a ativação das esterases da mucilagem do café tornamos evidente a desnecessidade de temperaturas elevadas para a desgomação do café despolpado. Estes pontos serão, por nós, estudados em publicações subseqüentes.

Agradecemos à Ind. Brasil, de Produtos Químicos, na pessoa do Dr. C. PEREIRA, um de seus Diretores, a colaboração bibliográfica.

A METHOD FOR QUICK FREEING OF PULPED COFFEE BEANS FROM THEIR MUCILAGE THROUGH ACTIVATION OF ITS OWN ENZYMES. I.
PANCREATIC ESTERASES AND CATIONIC ACTIVATORS FOR
FREEING OF MUCILAGE

A b s t r a c t

The ripe coffee-bean in the cherry has been known for a long time to be the best material for the production of the finest commercial coffee, highly prized for its aspect and flavour.

The high water content and the fermentability of the pulp carbohydrates, besides delaying the drying of the cherries, favour the development of noxious bacterial and fungous fermentations. This entails, in most producing zones of this State, a depreciation of the commercial value, through a degradation of the appearance and chiefly of flavour.

The rapid elimination of the mucilage adhering to the parchment enveloping the beans is, then, a necessity.

Taking advantage of the low specificity of the esterases, a crude enzyme preparation was made of pancreas and salivary glands of rats.

After adjusting the pH of the bath to alkalinity, with NaHCO_3 , or CaOH_2 (in presence of 0,4 percent NaCl as activator, at room temperature of 19°C , in an arbitrary time of an hour) it was found that the pancreas esterases had freed the pulped coffee beans from their mucilage. Under CaOH_2 the esterases acted even better.

The water, or water plus activator controls, were negative or very slightly active, especially in the presence of CaOH_2 . This alkali plus activator proved almost as active as the media containing the added ferments.

The demonstration of the activation of the esterases of pulped coffee, shows the addition of ferments to be useless.

BIBLIOGRAFIA

- CALDEIRA, ANTONIO DA SILVEIRA — 1843 — Memoria sobre um novo método de preparar o café, precedido de algumas noticias historicas do cafezeiro, seu fructo e dos diversos modos de preparar seguidos até o presente. Rio de Janeiro. Typografia Universal de Laemmert.
- CAMARGO, ROGÉRIO — 1949 — Do preparo do café. Diretoria de Publicidade Agrícola. Publ. n.º 799. Secret. da Agricultura do Estado de São Paulo.
- HINTON, C. L. — Fruit pectins. — Their chemical behaviour and jellying properties. 1940. Chemical Publishing Co., Inc. New York, N. Y.
- KRUG, H. P. — 1940-a — Cafés duros. *Rev. Inst. Café, E. São Paulo*, 26 (159): 636-638.
- KRUG, H. P. — 1940-b — Cafés duros. II — Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. *Rev. Inst. Café, E. São Paulo*, 27 (163): 1393-1396.
- KRUG, H. P. — 1940-c — Cafés duros. III — Relação entre a porcentagem de microorganismos e qualidade do café. *Rev. Inst. Café, E. São Paulo*, 27 (165): 1827-1831.
- KRUG, H. P. — 1941 — Cafés duros. IV — Relação entre zonas, qualidade de café e porcentagem de microorganismos. *Rev. Inst. Café, E. São Paulo*, 28 (169): 828-295.
- KRUG, H. P. — 1949 — A origem dos cafés duros. Diret. de Publ. Agrícola. Publ. N.º 798 Secret. da Agricultura do Estado de São Paulo.
- PERRIER, A. — 1931, Recherches sur le rôle de la pectinase dans la fermentation du café. *C. R. Ac. des Sciences*, 193: 547-548, 1931.
- PERRIER, A. — 1932-a — Recherche sur la fermentation du café. *C. R. Ac. des Sciences*, 194: 306-308.
- PERRIER, A. — 1932-b — Cafés despulpados. *Revista de Agricultura*. 7 (3 e 4): 103-113.
- SUMNER, J. B. e K. MYRBÄCK — The enzymes Chemistry and mechanism of action — I (1) 1950. Academic Press, Inc. New York.
- SUMNER, J. B. e G. F. SOMERS — Chemistry and methods of enzymes. 1943. Academic Press, Inc. New York.
- VON LILIENFELD-TOAL, OTTO A. — 1932 — Uber Kaffeefermentation. *Zentralblatt f. Bakteriol. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 2 (85): 250-269.
-

EXPERIÊNCIAS PARA O CONTRÔLE DAS PODRIDÕES DO ENGAÇO E PEDICELO DA BANANA

POR

A. C. Andrade, D. Puzzi e S. C. A. Torres

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Os cachos de banana, durante o transporte e o subsequente período de amadurecimento, são afetados por diferentes tipos de podridões que, na maioria das vezes, acarretam perdas consideráveis, bem assim, influem no valor comercial da fruta quando chega ao seu destino. As principais podridões são: a do engaço, causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa*, (de Seyne) VON HOHN e a do pedicelo, causada pelo fungo *Gloeosporium musarum* (CKE & MASSEE).

Os problemas técnicos do transporte da banana nanica (*Musa cavendishii*) LAMB. já foram abordados sob diversos aspectos por BITANCOURT (3), que realçou a importância das podridões sobre o sucesso da exportação da banana brasileira para os portos europeus.

Encarando o problema de exportação da banana como fonte de divisas para a economia nacional, veremos que, no momento, a cultura de banana em S. Paulo está em período de franco crescimento, isto após atravessar, durante a última guerra, uma fase de acentuado declínio de produção. E' sabido também que a cultura da banana depende em grande parte da exportação e que, nos últimos anos, foram exportados quase 12 milhões de cachos anuais e sempre por melhores preços que os do mercado interno.

Em virtude, portanto, desta crescente importância econômica da exportação de banana, que poderá, no futuro, tomar novo impulso com a conquista de novos mercados europeus, julgamos que seria oportuno realizar trabalhos experimentais com modernos fungicidas para o controle dessas podridões.

Revendo-se a literatura sobre o controle das podridões dos cachos de banana verifica-se que é muito escassa.

Em Martinica e Guadelupe foram efetuadas experiências em 1952 (2), que mostraram bons resultados no controle das podridões dos cachos pela pincelagem do engaço com vaselina boratada e azul de metileno logo após o corte.

Trabalhos de PARHAM (5), em 1949 efetuados em Fiji, provaram que os cachos provenientes de culturas pulverizadas com calda bordalesa mostraram menos podridões do engaço e amadureceram

mais satisfatoriamente em Nova Zelandia do que os provenientes de culturas não pulverizadas.

Em 1949, foi regulamentado em Nova Gales do Sul, Austrália (1), o uso compulsório do tratamento de todos os cachos, colhidos entre 1.º de Maio e 30 de Novembro, com produtos a base de salicilanilida. O objetivo do tratamento é controlar a doença denominada "squirter", causada pelo fungo *Nigrospora sphaerica* (SACC.) Mason, que provoca podridões típicas nas frutas após o período de transporte, e outras podridões, como de *Gloeosporium musarum*. A medida é executada, em geral, mergulhando-se a caixa, que contém os cachos despencados, na solução do fungicida.

Para fiscalização da execução do tratamento com salicilanilida, foi publicado por O'NEILL (4) uma técnica de campo simples para verificar a presença de quantidades mínimas de salicilanilida na casca da banana. Recentemente, surgiram notícias do aparecimento no mercado do fungicida "Shirlan" WS (a base de salicilanilida), da Plant Protection Ltd., que informavam sobre os bons resultados obtidos no controle da podridão do engão e dos pedicelos da banana pelos exportadores da Austrália e Jamaica.

Os dados existentes sobre o efeito do "Shirlan" WS na preservação das podridões da banana referem-se unicamente ao mergulho do cacho, que foi em seguida embarcado com refrigeração.

No presente trabalho, comparou-se o método preconizado na Austrália e Jamaica, de mergulhar os cachos, com a sua pulverização logo após o corte, cujos resultados mostraram-se mais promissores e práticos nas condições da cultura.

Foram realizadas três séries de experiências e três embarques experimentais para Londres, cujos detalhes passamos a relatar:

1.ª SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Material e métodos — Foram utilizados cachos de banana nanica tipo exportação, isto é, com nove pencas no mínimo, cedidos gentilmente pelo Frigorífico Anglo S. A. e provenientes da sua Fazenda "Trindade" em Santos.

Os tratamentos foram efetuados em 19-4-55 com o objetivo de estudar os seguintes fatores: método, época de aplicação e dosagem.

Os métodos de aplicação experimentados foram os seguintes: a) mergulho dos cachos numa solução de "Shirlan" WS 0,5%, durante cerca de 2 minutos, b) pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS a 0,6%, c) pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS a 0,5%, d) pulverização das regiões do corte com "Shirlan" WS

0,6%, e) pincelagem das regiões do corte com a mesma solução anterior, f) mergulho do cacho numa solução de "Dowicide" A (ortofenilfenato de sódio) 2% + Hexamina 1,5%, g) pincelagem das regiões do corte com permanganato de potássio 40/00 + vaselina e h) testemunha.

As épocas de aplicação foram: a) logo após o corte e b) após seis horas do corte.

As dosagens experimentadas foram as seguintes: 0,3%, 0,4% e 0,5%.

O método adotado foi o de mergulhar os cachos na solução de "Shirlan" WS.

Em todos os tratamentos com "Shirlan" WS usaram-se 25 cc de "Agral" LN para 100 litros de solução para obter um melhor revestimento da superfície do cacho.

Foram usados 10 cachos de banana para cada tratamento.

Os cachos, após o corte, eram transportados para as margens da linha de "trolley", onde se efetuava o tratamento respectivo. Em seguida, eram embalados, da maneira usual para exportação, envolvidos por uma folha de papel resistente, colocando-se nas primeiras pencas uma proteção constituída por um cilindro de folhas secas de banana e, por último, o cacho era protegido por uma esteira de palha de centeio e convenientemente amarrado. Após um intervalo de cerca de 12 horas os cachos eram transportados por chatas para Santos e depositados no armazém do Frigorífico Anglo.

A técnica empregada, para avaliar a eficiência dos preservativos para banana, consistiu em armazenar os cachos em temperatura ambiente, que variou entre 20°C e 26°C.

Todos os cachos foram examinados semanalmente durante 3 semanas consecutivas, para se observar o desenvolvimento das podridões do engaço e pedicelos. Nas duas primeiras observações em 26-4 e 3-5, anotou-se a presença ou a ausência de início da podridão do engaço, registrando-se a percentagem dos cachos com sintomas iniciais da doença. Com relação à podridão dos pedicelos, na observação de 26-4, apurou-se a percentagem de cachos que apresentavam alguma lesão nas pencas extremas. Posteriormente, observou-se em muitos casos que havia somente um sintoma inicial de podridão do engaço cujo desenvolvimento paralizava-se, mantendo-se o engaço com boa turgescência, permanecendo a 1.^a penca com aspecto sadio e, portanto, com dano econômico desprezível. Na observação de 10-5 convencionou-se dar nota 100 para um tipo de podridão do engaço, que se estendia até a 1.^a penca e deu-se nota 50 para a podridão que se limitava somente à extremidade do engaço.

A podridão do pedicelo foi avaliada, contando-se o número de “dedos” ou bananas com lesões e tomando-se um número médio de frutas na 1.^a, 2.^a, 3.^a, 4.^a, 5.^a, 6.^a, 7.^a, 8.^a, 9.^a pencas, ou seja pencas de 24, 22, 20, 18, 18, 16, 14, 14, 14 frutas cada respectivamente, a fim de se transformarem os dados em percentagem de podridão do pedicelo.

Os dados referentes a podridão do engaço foram analisados estatisticamente, usando-se a transformação $\text{arc sen } \sqrt{x}$, quando os dados estavam expressos em percentagem e comparando-se a variância entre os tratamentos com a variância dentro dos tratamentos.

Resultados — Nas tabelas I, II e III, encontram-se as médias das percentagens de podridão do engaço e pedicelo observadas durante três semanas de armazenamento.

TABELA I

Resultados da 1.^a série de experiências com preservativos para banana referente a métodos de aplicação. A podridão do engaço (P. E.) e a podridão do pedicelo (P. P.) estão expressas em percentagem. Média de 10 cachos.

OBSERVAÇÃO

TRATAMENTOS	1. ^a 26-4-1955		2. ^a 3-5-1955		3. ^a 10-5-1955		% cachos livre de podridão do engaço
	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	
Mergulhar “Shirlan” WS 0,5%	20	80	40	1,9	25,0	12,6	60
Pulverizar “Shirlan” WS 0,6%	0	20	0	1,0	0	6,2	100
Testemunha	20	50	60	3,8	77,7	18,9	0
Pincelar “Shirlan” WS 0,6%	0	50	20	2,4	9,1	4,7	80
Permanganato de potássio + vaselina	60	80	70	3,5	70,0	40,8	20
Pulv. só engaço “Shirlan” WS 0,6% ..	0	60	0	2,5	5,0	5,0	90
Pulv. “Shirlan” WS 0,5%	0	70	10	2,2	13,6	5,0	70

TABELA II

Resultados da 1.^a série, comparando-se épocas de aplicação. A podridão do engaço (P. E.) e a podridão do pedicelo (P. P.) estão expressas em percentagem. Média de 10 cachos

OBSERVAÇÃO

TRATAMENTOS	1. ^a 26-4-1955		2. ^a 3-5-1955		3. ^a 10-5-1955		% cachos livre de podridão do engaço
	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	
Mergulhar “Shirlan” WS 0,5% logo após o corte	40	70	60	2,6	50,0	15,4	20
Mergulhar “Shirlan” WS 0,5% 6 horas após o corte	20	40	70	2,2	45,0	19,2	30
Testemunhas após o corte	80	60	80	4,1	77,8	40,5	11,1
Testemunhas 6 horas após o corte	20	30	70	2,4	65,0	30,8	10,0

TABELA III

Resultados da 1.^a série, usando-se diferentes doses de "Shirlan" WS. A podridão do engaço (P. E.) e a podridão do pedicelo (P. P.) estão expressas em percentagem. Média de 10 cachos

OBSERVAÇÃO

TRATAMENTOS	1. ^a 26-4-1955		2. ^a 3-5-1955		3. ^a 10-5-1955		% cachos livres de podridão do engaço
	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	P. E.	P. P.	
Mergulhar "Shirlan" WS 0,3%	50	70	20	4,9	45,0	18,7	50
Mergulhar "Shirlan" WS 0,4%	50	80	30	3,4	27,3	8,6	60
Mergulhar "Shirlan" WS 0,5%	40	70	70	3,1	55,0	8,3	30
Testemunha	80	70	60	2,9	61,1	17,4	33,3

A análise estatística dos dados da tabela I, referentes à podridão do engaço em 10-5, revela um efeito altamente significativo entre os tratamentos, quando comparado com a variância "dentro dos tratamentos". Pode-se concluir, portanto que o melhor comportamento de alguns tratamentos não foi devido simplesmente ao acaso. Destacaram-se os seguintes tratamentos: pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS 0,6%, pulverização do engaço com "Shirlan" WS 0,6% e pincelagem do engaço com "Shirlan" WS 0,6%. Por outro lado, a pincelagem com permanganato de potássio e vaselina comportou-se de modo semelhante à testemunha. Entre os dois grupos, encontra-se o mergulho com "Shirlan" WS 0,5%, inferior mesmo à pulverização com esse produto.

Como consequência do comportamento pouco satisfatório do mergulho em "Shirlan" WS, os resultados das experiências quanto à época de aplicação e à dosagem, também não foram estatisticamente significativos.

Outrossim, verifica-se, nas tabelas I, II e III, um paralelismo entre a incidência da podridão do engaço, sob o critério absoluto da presença ou ausência de infecção por *Thielaviopsis* e a determinação da podridão do engaço, sob o critério convencionado para a leitura de 10-5.

A intensidade da podridão do pedicelo nas diferentes pencas, ao término da terceira semana de armazenagem, está expressa nas tabelas IV, V e VI.

TABELA IV

Intensidade da podridão do pedicelo expressa em percentagem, na experiência de métodos de aplicação. Média de 10 cachos. Observação efetuada em 10-5-1955

P E N C A S

TRATAMENTOS	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	7. ^a	8. ^a	9. ^a	Média
Mergulhar "Shirlan" WS 0,5%	6,2	4,1	0	0	6,1	1,8	0	42,1	52,8	12,6
Pulverizar "Shirlan" WS 0,6%	9,2	1,8	0	3,3	1,1	10,0	10,0	5,0	15,0	6,2
Testemunha	72,2	28,0	13,5	11,1	2,0	0	5,5	10,0	28,0	18,9
Pincelagem "Shirlan" WS 0,6%	5,4	13,2	1,5	1,7	0,5	0,5	2,9	7,1	10,0	4,7
Permanganato de potássio + vaselina	67,0	52,0	53,0	45,0	25,0	25,0	10,0	35,0	55,0	40,8
Pulv. só do engaço "Shirlan" WS 0,6% ..	7,9	10,0	1,5	0,5	0	0	0	7,8	17,5	5,0
Pulv. "Shirlan" WS 0,5%	17,9	5,8	2,5	0	0	0	0,7	3,3	15,0	5,0

TABELA V

Intensidade da podridão do pedicelo, expressa em percentagem, na experiência de comparação entre épocas de aplicação. Média de 10 cachos. Observação efetuada em 10-5-1955

P E N C A S

TRATAMENTOS	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	7. ^a	8. ^a	9. ^a	Média
Mergulho Shirlan WS 0,5% logo após o corte	30,0	39,0	12,5	2,8	0,5	1,2	5,0	25,0	23,0	15,4
Mergulho Shirlan WS 0,5% 6 horas após o corte	22,0	16,8	15,0	11,0	10,6	10,0	10,0	27,5	50,0	19,2
Testemunha logo após o corte	61,6	67,0	60,0	62,5	26,0	21,2	10,0	12,5	44,0	40,5
Testemunha 6 horas após o corte	45,0	47,5	32,5	27,5	20,0	20,0	21,0	26,0	38,0	30,8

TABELA VI

Intensidade da podridão do pedicelo, expressa em percentagem, na experiência de diferentes doses de "Shirlan" WS. Média de 10 cachos.

Observação efetuada em 10-5-1955

P E N C A S

TRATAMENTOS	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	7. ^a	8. ^a	9. ^a	Média
Mergulhar Shirlan WS 0,3%	53,3	27,5	15,1	1,6	1,6	1,2	15,5	20,0	32,5	18,7
Mergulhar Shirlan WS 0,4%	16,0	14,0	15,0	0	0	0	10,0	7,5	15,0	8,6
Mergulhar Shirlan WS 0,5%	27,5	18,3	3,5	3,3	0,5	0,5	0	13,3	7,5	8,3
Testemunha	58,0	44,0	32,0	9,5	2,2	0	1,4	3,6	6,0	17,4

Os dados da observação, no fim da primeira semana de armazenagem, revelam que grande maioria dos cachos foi danificada mecanicamente durante o transporte, mas o efeito do tratamento se fez sentir evitando o desenvolvimento de fungos e a ampliação das lesões. Constatou-se que as pencas situadas nas extremidades do cacho são mais atingidas pela podridão do pedicelo do que as localizadas no interior do cacho.

Os tratamentos que apresentaram menor porcentagem de podridão do pedicelo foram: pincelagem com “Shirlan” WS 0,6%, pulverização com “Shirlan” WS 0,6 e 0,5%, e pulverização do engajo. O mergulho em “Shirlan” WS 0,5% não apresentou resultados tão satisfatórios quanto os da pulverização.

O “Dowicide” A 2%, embora tenha sido aplicado, não constou nas tabelas, porque provocou uma queimadura muito intensa dos cachos.

2.^a SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Material e método — A 2.^a série de experimentos efetuou-se em 18-5 com banana nanica tipo exportação proveniente da Fazenda Trindade. Procurou-se confirmar os resultados da experiência anterior pulverizando-se todo o cacho com “Shirlan” WS, comparando-se este tratamento com outros. Verificou-se também o efeito do cilindro na proteção da 1.^a penca. Os tratamentos foram efetuados em 20 cachos divididos em 4 grupos de 5 cachos cada. Procurou-se, deste modo, eliminar algum efeito do local da colheita do cacho sobre o aparecimento das podridões.

Os tratamentos efetuados foram os seguintes: pulverização com “Shirlan” WS 0,6% em quatro diferentes combinações ou seja: a) cachos empacotados com resíduo seco, com cilindro protetor; b) cachos empacotados com resíduo seco, sem cilindro protetor; c) cachos empacotados com resíduo úmido e com cilindro protetor; d) cachos empacotados com resíduo úmido, sem cilindro protetor.

Nos demais tratamentos adotou-se a técnica de embalagem usual, isto é, com papel resistente, cilindros protetores e esteira de palha de centeio e foram os seguintes: a) pulverizações de todo o cacho com “Shirlan” WS 1%, b) pulverização com “Dowicide” A 2% + Hexamina 1,5%, c) pincelagem com “Prinzon”, d) pincelagem com permanganato de potássio 4‰ + vaselina, e) Testemunha.

A técnica experimental usada foi a mesma descrita anteriormente.

Resultados — Os resultados da 2.^a série de experiências encontram-se na tabela VII.

TABELA VII

Resultados da 2.^a série de experiências com diferentes preservativos para banana, mostrando a podridão do engaço expressa em percentagem.

Média de 20 cachos

OBSERVAÇÃO

TRATAMENTO	25-5	1-6	8-6	% de cachos livre de podri- dão do en- gaço
Pulverizar Shirlan WS 0,6% S. A. (*)	0	5,0	15,0	75,0
Pulverizar Shirlan WS 0,6% S. a (*)	0	2,5	12,5	80,0
Pulverizar Shirlan WS 0,6% s. A (*)	0	0	12,5	80,0
Pulverizar Shirlan WS 0,6% s. a' (*)	0	0	12,5	75,0
Pulverizar Shirlan WS 1%	0	2,5	12,5	75,0
Pulverizar Dowicide A 2% + Hexamina 1,5%	25,0	37,5	52,5	25,0
Prinzon (Pincelagem)	27,5	45,0	72,5	10,0
Permanganato de potássio + vaselina	22,5	52,5	77,5	0
Testemunha	20,0	52,5	70,0	20,0

(*) Tipo de empacotamento

S — resíduo seco a — sem cilindro

A — com cilindro s — resíduo úmido

A análise estatística da 3.^a observação, em 8-6, referente à podridão do engaço, revelou um efeito altamente significativo dos tratamentos. Verifica-se que houve uma boa uniformidade nos resultados dos lotes pulverizados com “Shirlan” WS 0,6% que não se mostraram inferiores aos daqueles pulverizados com “Shirlan” WS 1%. O “Dowicide” A mostrou-se novamente fitotóxico, provocando manchas negras nas frutas e não protegeu adequadamente o engaço. O “Prinzon”, a pincelagem com permanganato de potássio + vaselina e a testemunha acusaram uma fraca proteção do engaço.

Com relação à podridão dos pedicelos, cujos resultados se acham na tabela VIII, constata-se que o cilindro protetor da 1.^a e 2.^a pencas reduziu ligeiramente os danos mecânicos do transporte. De modo geral, os resultados confirmam aqueles alcançados na 1.^a série.

3.^a SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Material e método — A 3.^a série efetuou-se no dia 4-8, com banana nanica, tipo exportação, na Fazenda “São Sebastião”. Os tratamentos consistiram em pincelagem do engaço com “Shirlan” WS 0,6%; pulverização de todo o cacho com “Shirlan” WS 0,6%, pincelagem com permanganato de potássio + vaselina e testemunha. Cada tratamento foi feito em 20 cachos.

TABELA VIII

Resultados da 2.^a série de experiências, indicando a porcentagem de podridão do pedicelo. Média de 20 cachos

TRATAMENTOS	Cachos	P E N C A S									
		1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	7. ^a	8. ^a	9. ^a	Média
Pulverizar Shirlan WS 0,6% S. A	25-5	2,7	2,5	0	0	0	0	0	0,3	2,5	0,89
	1-6	7,0	4,1	0,2	0,3	0	0	0,3	0,7	3,2	1,78
	8-6	19,4	11,1	3,3	0,5	0	0	0,3	3,1	6,0	4,89
Pulverizar Shirlan WS 0,6% S. a	25-5	8,3	3,0	0,5	0	0	0,6	0,3	2,5	3,9	2,07
	1-6	8,8	8,6	0,5	0	0	0	0	1,4	4,9	2,70
	8-6	25,6	17,3	3,2	3,0	2,5	0	1,4	5,7	8,8	7,52
Pulverizar Shirlan WS 0,6% s. A	25-5	4,8	3,6	0,5	0	0	0	0,3	2,5	5,0	1,86
	1-6	7,5	5,1	1,0	0	0	0	0	1,8	5,0	2,26
	8-6	16,6	7,7	3,0	0	0	0	0	9,8	12,8	5,56
Pulverizar Shirlan WS 0,6% s. a	25-5	6,6	5,7	1,2	0,6	0,2	0	0	1,8	3,9	2,24
	1-6	12,4	9,8	5,0	1,1	0	0	0	0,7	5,7	3,37
	8-6	20,8	23,2	12,2	4,1	2,8	3,1	3,5	4,6	17,1	10,19
Pulverizar Shirlan WS 1%	25-5	3,3	2,7	0,2	0	0	0	0	1,0	2,9	1,14
	1-6	7,2	4,8	1,0	0	0,3	0	0	0,7	3,9	1,99
	8-6	15,0	15,9	1,2	0,8	0	0	0,7	6,7	11,6	5,79
Pulverizar Dowicide A 2% + Hexamina 1,5%	25-5	5,8	7,7	1,3	0	0	0	0	2,1	5,0	2,44
	1-6	16,6	15,0	4,5	0	0	0	0	1,4	10,2	5,32
	8-6	29,3	42,9	19,5	15,0	15,0	15,0	15,0	23,5	46,4	24,64
Pincelar Prinzon	25-5	5,2	7,3	2,3	0	0	0	0	1,8	4,3	2,37
	1-6	14,3	12,5	3,2	0,6	0	0	0	3,2	4,6	4,33
	8-6	51,2	39,5	25,5	21,9	20,0	20,0	26,8	26,7	55,6	29,71
Pincelar Permanganato de potassio + vaselina	25-5	6,6	3,6	0,8	0	0	0	1,0	0,3	0,7	1,47
	1-6	23,5	22,7	2,0	0	0	0	0	1,0	8,2	6,39
	8-6	46,9	50,7	36,0	30,0	32,5	30,0	37,5	37,5	39,9	37,89
Testemunha	25-5	7,9	6,4	0,5	0,5	0	0,3	0	1,0	1,8	2,06
	1-6	14,0	11,1	7,7	0,8	0,2	0	0	2,5	5,0	4,62
	8-6	43,1	48,7	33,0	24,5	25,8	22,5	20,0	26,4	37,4	31,83

A experiência foi realizada para comparar os resultados entre os lotes embarcados para Londres e aqueles armazenados em temperatura ambiente, os quais não sofreram, portanto, refrigeração.

Resultados — A tabela IX mostra os resultados da 3.^a série, com relação somente à podridão do engaço.

A análise estatística da observação de 23-8, com relação à podridão do engaço, revela um efeito altamente significativo dos tratamentos. Os resultados indicam um comportamento ligeiramente superior da pincelagem com “Shirlan” WS 0,6% sobre a pulverização. Novamente verificou-se a inferioridade da pincelagem com permanganato + vaselina.

TABELA IX

Resultados da 3.^a série de experiências, em percentagem de podridão do engaço. Média de 20 cachos

TRATAMENTO	OBSERVAÇÃO			
	12-8	19-8	23-8	% cachos livres de podridão do engaço
Pincelagem "Shirlan" WS 0,6%	0	0	4	90
Pincelagem "Shirlan" WS 0,6%	4	12	16	72
Pincelagem permanganato de potássio + vaselina	87	64	75	11
Testemunha	40	60	77	11

Constatou-se a ausência da podridão do pedicelo, pois até a 3.^a observação as pencas se apresentaram sadias.

EMBARQUES EXPERIMENTAIS

A prova definitiva da eficiência do produto deve ser julgada quando todas as operações de transporte e refrigeração tiverem sido executadas. Com êste objetivo, estabelecemos contato com as firmas inglesas Plant Protection Ltd. e S. A. Frigorifico Anglo, para se efetuarem pequenos embarques de bananas tratadas e verificar seu estado sanitário ao chegar ao pôrto de Londres.

Foram feitos 3 embarques experimentais em diferentes épocas do ano.

O 1.^o embarque, feito com cachos provenientes da Faz. Trindade, efetuou-se em 19-5-55 e recebeu 6 tratamentos: pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS nas doses de 0,6 e 1% com cilindro protetor; o mesmo tratamento sem cilindro protetor, pincelagem com vaselina + permanganato de potássio e testemunha. Nos tratamentos com "Shirlan" WS foi adicionado "Agral" LN a 0,02%. Foram usados 25 cachos para cada tratamento.

Nêste embarque, em vista da pouca incidência de doenças, não foi possível observar diferenças significantes entre os tratamentos. Outro fator, que influiu na ausência de doenças, conforme relato do escritório comercial do Frigorifico Anglo, foi o fato de as frutas terem sido manuseadas com excessivos cuidados e terem chegado em ótimo estado ao pôrto de destino.

No 2.^o embarque, efetuado em 7-8-55, foram enviados 400 cachos de bananas provenientes da Fazenda São Sebastião, com os seguintes tratamentos: pincelagem somente do engaço e umbigo com "Shirlan" WS a 0,6%, pincelagem com vaselina + permanganato de potássio e testemunha. Nos tratamentos com "Shirlan" WS, foi adicionado "Agral" LN a 0,02%.

Já neste lote, apesar da geada ocorrida dias antes dos tratamentos, houve considerável incidência de podridão do engaço, e conforme informações recebidas, o contrôlê das doenças foi plenamente satisfatório, como se vê pelo quadro abaixo, fornecido pelo Frigorifico Anglo.

TABELA X

Percentagem de podridão do engaço no 2.^o embarque experimental, destinado a Londres

TRATAMENTOS	Cachos sadios	Cachos infectados	% de cachos com podridão do engaço
Pincelagem engaço "Shirlan" 0,6%	53	37	41,1
Pulv. todo cacho "Shirlan" 0,6%	58	35	37,6
Pincelagem vaselina + permanganato	9	59	86,8
Testemunha	10	60	85,7

Vê-se que o produto deu mais de 45% de contrôlê à doença quando comparado com o tratamento padrão e a testemunha.

Informaram ainda que inicialmente os lotes tratados com "Shirlan" WS estavam quase idênticos, havendo sòmente 2 cachos com podridão do engaço. A maioria dos cachos estava sadia e verde e durante êste estágio (2 dias na câmara de etileno em Londres) não houve sinal de podridão do pedicelo.

Nos lotes testemunhas e tratamento padrão as frutas estavam ligeiramente mais maduras que nos lotes anteriores. Uma considerável quantidade de podridão do engaço era observada em diversos cachos.

Apesar da incidência de doenças neste embarque ter sido maior do que no anterior, ainda foi considerado pelos técnicos ingleses que os cachos foram tratados com muito cuidado e possivelmente selecionados.

O 3.^o embarque foi efetuado em 29-10 com bananas provenientes da Fazenda "São Sebastião", usando-se 145 cachos para cada um dos tratamentos, que foram os seguintes:

Pincelagem do engaço com "Shirlan" WS 1,2%, pulverização só do engaço com "Shirlan" WS 1,2%, pulverização de todo o engaço com "Shirlan" WS 0,6% e Testemunha.

O agente molhante-espalhante usado foi "Agral" LN a 0,02%.

Em fins de Novembro, recebemos as seguintes informações dos técnicos ingleses, sôbre êste embarque, cujos resultados estão resumidos na tabela XI.

TABELA XI

Percentagem de doença no 3.º embarque experimental destinado a Londres.
Observação de 25-11-1955

TRATAMENTOS	Podridão do engajo	Queda das frutas (finger drop)	% de pedicelos infectados	Grau de maturação
Pincelagem com "Shirlan" WS 1,2%	31,0	19,0	50,0	18,0
Pulv. engajo com "Shirlan" WS 1,2%	25,7	20,0	38,3	8,3
Pulv. todo cacho "Shirlan" WS 0,6%	15,0	10,0	26,6	6,7
Testemunha	46,7	18,3	46,7	16,7

Os resultados mostram que a pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS deu melhor contrôle da *Thielaviopsis paradoxa* do que o tratamento do engajo sòmente.

Os resultados indicam que, mesmo que a ocorrência de *Thielaviopsis* no engajo seja leve, o fungo pode provocar danos severos entrando nas feridas que se abrem nos pedicelos durante o transporte, assumindo então as podridões importância econômica. E' justamente nestas condições que a pulverização de todo o cacho com "Shirlan" WS apresenta resultados mais destacados do que o tratamento somente do engajo, sem proteção, por conseguinte, dos pedicelos.

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que com os métodos experimentais empregados se pode selecionar com rigor o tipo de preservativo e seu método de aplicação, pois a incidência das podridões foi bastante intensa nas testemunhas. Possivelmente, a refrigeração, que a banana sofre durante o transporte, atenua o efeito das podridões ou pode provocar danos de outra natureza, que mascaram o efeito dos preservativos.

A operação de mergulho, além de apresentar grandes dificuldades na sua execução, devidas às condições peculiares da cultura, poderá também causar danos mecânicos ao cacho.

Por outro lado, devido ao revestimento ceroso da epiderme da banana, é provável que o depósito que se constitui pelo mergulho do cacho possa ser menor que o obtido na pulverização, quando se evita a lavagem do cacho.

A pulverização dos cachos após o corte constitui uma operação razoavelmente viável na prática e apresentou resultados satisfatórios e uniformes.

Na realidade, a pincelagem do engaço é a técnica mais rápida e facilmente adaptável às rudes condições da cultura. Os resultados obtidos com este tipo de tratamento para o contrôle da podridão do engaço foram idênticos aos obtidos com a pulverização total do cacho, mas o contrôle da podridão dos pedicelos nem sempre é assegurada.

Conforme BITANCOURT, no seu trabalho sobre problemas técnicos do transporte da banana nanica, a podridão dos pedicelos ocorre com maior intensidade em determinadas épocas do ano. Observamos nos resultados das nossas experiências que a podridão do pedicelo manifestou-se mais intensamente em Abril e Maio. Em Agosto, pouco depois da onda de frio e geada que assolou certos locais do litoral, não se constatou a podridão do pedicelo. Os resultados da 1.^a série de experiências, em que os lotes pincelados e pulverizados com "Shirlan" WS tiveram uma percentagem análoga de podridão do pedicelo, deixam-nos um tanto surpresos, embora devemos admitir que a região pulverizada com "Shirlan" WS logicamente estará sempre melhor protegida contra a podridão do pedicelo.

O consumo médio de solução fungicida para a pulverização de todo cacho é de cerca de 280 cc por cacho. Cem litros de solução de "Shirlan" WS a 0,6% com um agente molhante-espalhante serão suficientes para tratar 360 cachos.

Comparando-se os resultados obtidos no contrôle das podridões da banana armazenada na temperatura ambiente, com os obtidos na refrigeração, parece-nos que os resultados são mais destacados nos lotes armazenados em temperatura ambiente, indicando que a refrigeração pode mascarar ou atenuar os sintomas das podridões do engaço e do pedicelo.

Em vista do exposto, o tratamento com "Shirlan" WS poderá ser de grande valia na exportação da banana para locais próximos, em navios que não dispõem de refrigeração, como para Argentina.

Julgamos que se deverá estudar a possibilidade de se tornar compulsório o tratamento da banana destinada à exportação, com o objetivo de se proteger o nosso produto nos mercados internacionais.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento indicam que se pode obter um contrôle satisfatório das podridões do engaço e dos pedicelos por meio de pulverizações com "Shirlan" WS a 0,6% logo após o corte do cacho.

AGRADECIMENTOS

À Firma S. A. Frigorífico Anglo, na pessoa do Sr. C. L. VEITCH somos gratos pelo seu elevado espírito de cooperação, propiciando-nos tôdas as facilidades para a execução dêste trabalho.

Apresentamos também nossos agradecimentos à Plant Protection Ltd., na pessoa do técnico E. J. HAINSWORTH pela sua valiosa colaboração nos exames das frutas no pôrto de Londres.

EXPERIMENTS FOR THE CONTROL OF THE STEM END ROT AND FINGER DROP ROT OF BANANA

A b s t r a c t

*Three experiments are reported, in this work, for the control of banana stem endrot finger drop (*Thielaviopsis paradoxa*) and *Gloeosporium musarum*) stored at environmental conditions. Three experimental shipments destined for the port of London were also carried out with treated bananas that were grown on the coastal lowlands of the State of São Paulo.*

The experiments were carried out to determine the best method of application of "Shirlan" WS (Salicylanilide fungicide), i. e., spraying of the whole bunch, dipping, spraying the cut stem only or brushing the cut stem only in comparison with the usual treatment vaseline/potassium permanganate — and also with "Dowicide" A and "Prinzon".

The results show that the best control of banana rots was given by spraying the whole bunch with "Shirlan" WS at 0,6% soon after harvest. This treatment presents the advantage over all others that due to its fungicide residue on the bunch, it will protect wounds that eventually occur during transit, and through which may occur infection by fungi that cause the above rots.

BIBLIOGRAFIA

1. ANONIMO — 1949 — Plant diseases Agric. Gaz N. S. W. 60, 4, pp. 193-197, 4 figs.
2. ANONIMO — 1942 — Les traitements chimiques des hampes et la pourriture des regimes de Bananes. *Fruits d'Outre Mer*, 7, 8 pp. 380-4 1952.
3. BITANCOURT — 1935 — Os problemas técnicos do transporte da banana nanica brasileira nos mercados europeus. *O Biológico vol. I*: 6 pp. 196-200; 7 pp. 226-230; 8 pp. 267-273; 9 pp. 312-318.
4. O'NEILL D. K. — 1949 — Testing Banana for salicylanilide. Suitable field technique developed. *Agric. Gaz N. S. W.* 60; 8, pp. 413-414, 1 fig.
5. PARHAM (B. E. V.) — 1949 — *Annual report of the Botanist for the year 1948* Coum. Pap. Fiji 24, pp. 31-35, 1949. Abstract R. A. M. XXIX, 5, pp. 251. 1950.

DETERMINAÇÃO BIOLÓGICA DO B.H.C. (ISÔMERO GAMA) EM SÓLOS DE LAVOURAS DE CAFÉ, TRATADAS COM ÊSSE INSETICIDA E SUA CONFIRMAÇÃO POR CROMATOGRAPHIA EM PAPEL

POR

A. Pigatti e O. Giannotti

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Entre os problemas que decorrem da aplicação dos inseticidas modernos no contrôlo das pragas das plantas, o que diz respeito à fitotoxidez desses compostos para as diversas espécies vegetais tem sido objeto de numerosas investigações.

O B. H. C., inseticida que vem sendo intensivamente usado entre nós, principalmente para o contrôlo das pragas do café e do algodão, tem sido largamente estudado sob esse aspecto. BROWN (1) no capítulo referente a esse assunto, faz numerosas referências a trabalhos em que os experimentadores procuram determinar a sensibilidade das diferentes espécies vegetais a esse inseticida, seja quando aplicado diretamente sobre a parte aérea das plantas, ou quando incorporado nos diferentes tipos de solos. Dessas experiências, concluiu-se, de um modo geral, que o B. H. C. é fitotóxico em concentrações mais ou menos elevadas e é relativamente estável no solo.

No Brasil, SILBERSCHMIDT (2, 8, 9) verificou o efeito fitotóxico de doses elevadas de B. H. C. no desenvolvimento de cafeeiros em vaso.

Em nossos experimentos, embora não se tenha, em condições de campo, verificado um evidente efeito nocivo desse inseticida em lavouras de café, julgamos de interesse investigar o comportamento do B. H. C. em solos de lavouras que vêm sendo regularmente com ele tratadas, determinando o teor do inseticida, para verificar se existe a possibilidade de acumulação prejudicial como consequência das repetidas aplicações.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo — A coleta das amostras realizou-se em propriedades localizadas na zona de Ourinhos, Chavantes e Ipaussú, em solo tipo terra roxa, onde foram feitas as primeiras aplicações de B. H. C. neste Estado para o contrôlo da “broca do café”, portanto, lavouras que vêm recebendo esse tratamento há mais de 7 anos. As amostras foram coletadas nos meses de Junho e Setembro de 1955, debaixo da “saia” dos cafeeiros e a 3 diferentes profundidades: de 0

a 5 cm, de 5 a 15 cm. e de 15 a 25 cm, respectivamente designadas pelas letras: *a*, *b* e *c*. A primeira amostra (*a*), que corresponde aproximadamente aos primeiros 5 cm de profundidade, era constituída de terra solta que é removida para as entrelinhas dos cafeeiros por ocasião da colheita. A segunda amostra (*b*) corresponde à camada de 5 a 15 cm e a terceira (*c*) a de 15 a 25 cm. Depois de colhidas, as amostras foram secadas à temperatura ambiente e em seguida tratadas com o solvente para a extração do inseticida.

As características das amostras são as seguintes:

Amostras 1 a 3 — Coletadas no talhão n.º 14 da fazenda “Sertaneza” que recebeu 13 tratamentos de B. H. C. a 1,5% i. g. e 1 a 3,0% i. g.

Amostras 5 a 7 — Coletadas no talhão n.º 9 da mesma fazenda que recebeu 15 tratamentos de B. H. C. a 1,5% i. g.

Amostras 9 a 11 — Coletadas na fazenda “Sant’Ana”; tratamentos de B. H. C. realizados desde 1948. Concentração e número de tratamentos exatos não conhecidos.

Amostras 13 a 15 — Coletadas no talhão n.º 17 da fazenda “Palmeiras” que recebeu 13 tratamentos de B. H. C. a 1,5% i. g., 4 a 2% i. g. e 7 a 1% i. g.

Amostras 17 a 19 — Coletadas na fazenda “São Luiz”; tratamentos de B. H. C. realizados desde 1948. Concentração e número de tratamentos exatos não conhecidos.

Amostras 21 a 23 — Coletadas na fazenda “Santa Rosa”; B. H. C. usado sob a forma de pulverização — não se conhece exatamente a quantidade total de inseticida aplicado.

Amostras 25 a 27 — Coletadas no talhão n.º 5 da fazenda “Santo Antonio” que recebeu 21 tratamentos de B. H. C. a 2% i. g.

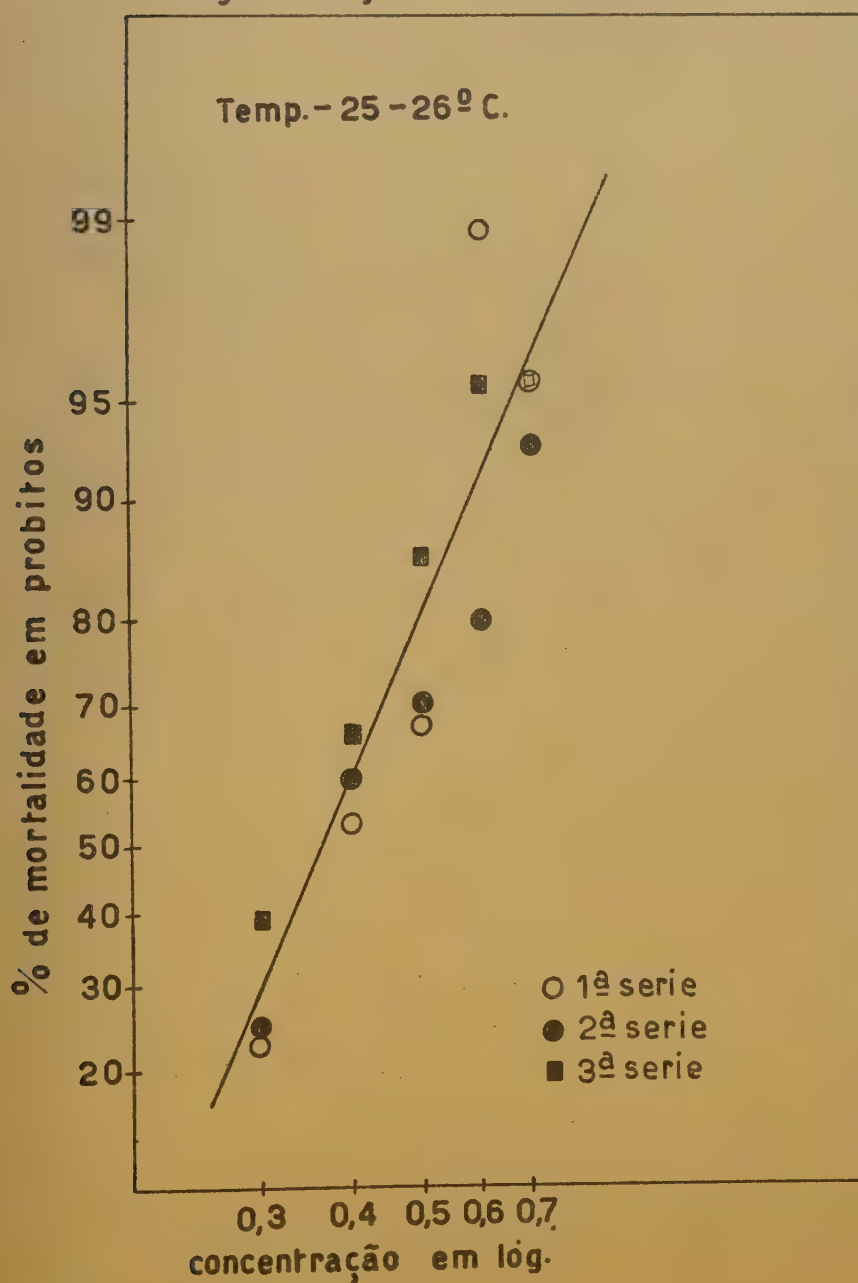
Amostras 29 e 30 — Coletadas na fazenda “Mombuca”, que recebeu 1 tratamento de B. H. C. a 1% i. g.

Amostra 31 — Contrôle — Coletada na fazenda “Santaneza”, distante da cultura tratada.

Amostra 32 — Contrôle para verificar a recuperação do método de extração. Foi usado o solo contrôle — amostra 31 — ao qual foi adicionado B. H. C. i. g. na proporção de 0,05 p. p. m.

O cálculo da quantidade de isômero gama do B. H. C. aplicado por metro quadrado nos talhões de onde foram retiradas as amostras, foi baseado no número de aplicações feitas e na porcentagem do inseticida usado, considerando-se que cada pé de café, correspondendo a uma área de 16 m², recebe por tratamento, em média, 40 g do pó inseticida.

Fig.1—Curva de dosagem — mortalidade do isômero gama (B.H.C) para larvas no 3º "instar" de *Culex pipiens-fatigans* Say



Para os cálculos de recuperação do inseticida, consideramos a densidade aparente do solo igual a 1,5.

Método de extração — 20 g de sólo foram submetidas a extração duas vezes com 20 cm³ de clorofórmio, agitando-se para cada extração, durante 15 minutos, sendo o extrato obtido, tratado pelo processo de HOPKINS e MESSINGER (3), a fim de se eliminarem impurezas que viessem a interferir no teste biológico. A seguir, o clorofórmio foi evaporado por uma corrente de ar seco. O resíduo, dissolvido em acetona, foi utilizado na determinação biológica do inseticida. (Tab. I).

Determinação biológica do B. H. C. — Para esta determinação, foi construída uma curva de dosagem — mortalidade do isômero gama do B. H. C., pelo processo de probitos, para larvas de 3.º “instar” do mosquito — *Culex pipiens fatigans* SAY (Fig. I), para um tempo de 24 horas.

A técnica utilizada foi a seguinte: de 25 a 30 larvas eram colocadas em um copo de 5-6 cm. de altura, contendo 100 c³ de água e tratadas com 1 c³ de acetona, contendo quantidades conhecidas do inseticida.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

A tabela I resume os resultados obtidos. De um modo geral, pode-se observar que as quantidades de B. H. C. encontradas são muito pequenas no que diz respeito a um possível efeito fitotóxico.

Assim é que MORRISON (4) não encontrou efeito algum prejudicial às diversas espécies de plantas por ele estudadas, quando a quantidade de B. H. C. (isômero gama) é da ordem de 1 g por metro quadrado. Também WILSON J. K. e CHOUDHRI (5) verificaram a redução no crescimento de alguns vegetais somente em solos contendo mais de 30 p. p. m. de B. H. C. técnico, ou seja mais ou menos 3 p. p. m. do isômero gama. Os dados por nós encontrados são da ordem de 0,02 a 0,05 p. p. m., ou de 0,004 g. a 0,015 gr. de B. H. C. (isôm. gama) por metro quadrado. Aliás, o excelente aspecto das culturas, de onde foram retiradas as amostras, demonstram que não existe indício algum de um possível efeito fitotóxico.

Pela mesma tabela verifica-se que a maior quantidade de inseticida residual foi encontrada justamente no cafetal que, num período de 7 anos, recebeu uma aplicação total de 1.050 mg/m² isto é, o mais pesadamente tratado. Mas, mesmo nesse caso, o inseticida acumulado no sólo foi de apenas 0,05 p. p. m., isto é, muito inferior ao teor geralmente indicado na literatura como fitotóxico.

TABELA I

Quantidades de B. H. C. (isômero gama) recuperadas de solos de lavouras de café tratadas com êsse inseticida

N.º das amostras	Quantidades de B. H. C. (isômero gama) encontradas			Total de B.H.C. (is. gama) aplicada por m2 em mgr.	% de B.H.C. (is. gama) recuperada
	em ppm 3)	em mgr./m2	total em mgr./m2		
1a	0,03	2,5			
2b	0,02	3,0			
3c	0,02	3,0	8,5	600	1,4
5a	0,02	1,7			
6b	0,01	1,9			
7c	0,01	1,5	5,1	560	0,9
9a	0,03	2,1			
10b	0,02	2,3			
11c	0,01	2,0	6,4	—	—
13a	0,04	2,9			
14b	0,03	3,7			
15c	0,02	2,7	9,3	850	1,1
17a	0,03	2,0			
18b	0,02	3,0			
19c	0,02	2,7	7,7	—	—
21a	0,03	2,1			
22b	0,01	2,1			
23c	0	0	4,2	—	—
25a	0,07	5,2			
26b	0,04	5,4			
27c	0,03	4,8	15,4	1050	1,46
29a	0	0	0	25	0
30b	0	0			
31 ¹⁾	0	0	0	0	0
32 ²⁾	0,05				80

1) — extratos de solo controle

2) — extrato de solo em que foi adicionado o inseticida

3) — medias de 4 determinações

Sem dúvida nenhuma, grande parte do inseticida é perdida, ou por volatilização, porque o B. H. C. é uma substância regularmente volátil, ou por decomposição no sólo.

Parece, portanto, que a possibilidade de um acúmulo prejudicial no sólo é bastante remota. Contudo, é preciso destacar que nada pode ser adiantado no caso especial da cultura do café, quanto ao efeito acumulativo dessas pequenas quantidades de inseticida no decorrer de um longo tempo.

Os dados demonstram, também, que mais de 50% do inseticida encontrado se localiza nos primeiros 15 cm. do solo, com tendência a diminuir nas camadas mais profundas. GARGANTINI e GIANNOTTI (6) estudaram êsse aspecto do problema em condições de laboratório e verificaram que, de fato, o B. H. C., i. g., não é arrastado para as camadas inferiores do solo.

TABELA II

Teste biológico com larvas no 3.º instar de mosquitos (*Culex pipiens* — *fatigans* Say) de cromatografia de B. H. C. (Isom. gama) e de extratos de solos de lavouras tratados com êsse inseticida

N.º de Secção do papel	Porcentagem de mortalidade depois de 24 horas					
	10 mg de isom. gama	20 mg de isom. gama	Extrato de solo contro- le + 10 mg de isom. gama	Amostra 25	Amostra 13	Amostra 21
1	0	6	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0
4	0	12	0	0	6	0
5	43	0	6	27	68	0
6	97	0	6	100	80	0
7	85	30	73	100	81	0
8	24	100	53	100	100	20
9	11	100	40	20	93	20
10	0	9	13	0	0	20
11	0	0	0	0	13	0
12	0	0	13	0	0	0
13	0	0	6	0	0	0
14	0	0	6	0	0	0
15	0	0	6	6	0	0

A presença do isômero gama do B. H. C. nos extratos de solo, foi confirmada empregando-se um processo de cromatografia ascendente em tiras de papel de filtro, idêntico ao utilizado por GIANNOTTI, METCALF e MARCH (7) na separação do “Aldrin” e “Dieldrin”, utilizando-se o extrato clorofórmico de 40 g. de sólo. Os ensaios das cromatografias feitas com as amostras 25, 21 e 13 (Tab. II), confirmaram a presença do inseticida, uma vez que os valores do Rf das manchas de mortalidade dessas amostras, se mostraram bastante próximas dos contrôles (10 e 20 microgramas de B. H. C. i. g. e do extrato de solo contrôles a que foi adicionado o inseticida).

As pequenas variações notadas devem ser atribuídas a diferença na impregnação do papel com silicone, segundo numerosas observações que temos realizado em nossos trabalhos sobre o assunto.

BIOLOGICAL ASSAY OF B. H. C. (GAMMA ISOMER) IN SOILS OF COFFEE PLANTATIONS TREATED WITH THAT INSECTICIDE AND ITS CONFIRMATION BY PAPER CHROMATOGRAPHY

Abstract

A study was made on the accumulation of B. H. C. (gamma isomer) deposits in soils from 7 coffee farms as a result of commercial dust application for insect control during the last 7 years. The samples were collected under the trees, at 3 depths- 0 to 5, 5 to 15 and 15 to 25 cms. Biological test, using the 3^o "instar" of mosquitoes larvae (*Culex pipiens-fatigans* Say) was used to estimate the quantity of B. H. C. (gamma isomer). The maximum amount found was 0,015 g/m² in soil from coffee plantation that received 1050 mg/m² during 7 years, what means a low rate of accumulation. More than 50% of the insecticide was found in upper 15 cms. of soil. No plant injury was observed in the coffee-crops at that level of accumulation, however, it is difficult to know whether these minute quantities, acting during a longer period, will be dangerous to the plants or not. The presence of the insecticide was confirmed by paper-chromatography combined with bio-assay.

The soil was the so called "terra-roxa", which is of the clay type.

BIBLIOGRAFIA

- 1) — BROWN. A. W. A. — Insect control by chemicals. 1951 — New York — John Wiley. S. Sons., inc.
- 2) — O. GIANNOTTI e K. SILBERSCHMIDT — Dosagem biológica de B. H. C. em folhas de cafeeiros mantidos em vasos com terra misturada com B. H. C. 2.^a Reunião Latina Americana de Fitogeneticistas e Fitoparasitologistas. Campinas 1953 — pg. 68.
- 3) — HOPKINS W. M. and MESSINGER P. S. — 1950 — Microbioassay of Insecticide-residues in plant and tissues. *Adv. Chem. Series*, 1: 93-8.
- 4) — MORRISON, H. E. et al. 1948 — Effect of soil insecticides on plants. *J. Econ. Ent.* 41: 374-78.
- 5) — WILSON J. K. and R. S. CHOUDHRI 1948. B. H. C. and soil microflora. *J. Agr. Res.*, 77: 25-32.
- 6) — H. GARGANTINI e O. GIANNOTTI, — Comportamento do B. H. C. em solo tipo arenito de Baurú. (No prélo).
- 7) — O. GIANNOTTI, R. L. METCALF and R. B. MARCH — The mode of Action of Aldrin and Dieldrin. (No prélo).
- 8) — K. SILBERSCHMIDT — Efeitos fitotóxicos de doses elevadas de B. H. C. e Lindane sobre cafeeiros em vasos. 2.^a Reunião Latino Americana de Fitogeneticistas e Fitoparasitologistas. Campinas 1953 — pag. 68.
- 9) — K. SILBERSCHMIDT — Influência de doses elevadas de B. H. C. no desenvolvimento de cafeeiros em vasos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 20: 217-248. 1951.

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA SAÚVA (*ATTA* spp. — HYMENOPTERA-FORMICIDAE)

VI — INFESTAÇÃO RESIDUAL DA SAÚVA

POR

M. Autuori

Do Instituto Biológico de S. Paulo

INTRODUÇÃO

No decurso de vários anos, em experiências de combate à formiga saúva (*Atta* spp.) sempre verificamos uma notável persistência da infestação das formigas nas áreas onde, aparentemente, todas as colônias haviam sido extintas. Como veremos mais adiante, permaneceram no terreno saúveiros não atingidos pelo combate. Denominamos “infestação residual” a êsse fenômeno. No presente trabalho procuramos demonstrar que tal fato ocorre regularmente e explica aparentes insucessos, até mesmo, em combates executados com todo o rigor.

Procurávamos, por meio de combates experimentais, verificar a possibilidade de se exterminar, em uma área relativamente extensa, tôdas as colônias de saúva nela existentes, continuando a manter essa área sob controle para verificar o início e conseqüente desenvolvimento de nova infestação. No entanto, sempre constatávamos, pelas inspeções periódicas, que um apreciável número de colônias já bem desenvolvidas e em plena atividade alí estavam presentes, às vezes 2 ou 3 meses após o término do combate, como se tais colônias não houvessem sido atacadas. Tais combates, por terem caráter experimental, foram sempre executados cuidadosamente, com vistas principalmente à eficácia, não se tomando em consideração fatores outros, como: custo de formicida, mão de obra, etc.

A grande maioria dos formigueiros do gênero *Atta* sómente pode ser combatida com sucesso quando o formicida é aplicado nas aberturas de canais (“olheiros”) que se encontrem na área e na periferia da terra solta acumulada pelas formigas na superfície do solo e que correspondem, na maioria das vezes, à zona das “panelas” (1) no subsolo. Êste característico acúmulo de terra solta denuncia

(1) “Panelas” são as câmaras escavadas pelas formigas no subsolo onde são acumulados e tratados os vegetais cortados. Nas “panelas” as formigas fazem a cultura do fungo de que toda a população do ninho se alimenta. Representam a zona vital da colônia e portanto a que deve ser atingida pelos formicidas, quando se pretende extinguir uma colônia. Toda a população jovem está nela reunida. A “rainha” e, por ocasião do vôo nupcial, os machos e as futuras “rainhas”, também se acumulam nas “panelas”.

a presença de uma colônia de saúva. Os inúmeros canais que partem da “zona das painelas” e se espalham pela redondeza, aflorando na superfície do solo, são canais de carregamento de vegetais. Suas aberturas (“olheiros”) podem estar até quatrocentos metros de distância da colônia (“zona das painelas”). Por aí se vê que não há possibilidade de se exterminar uma colônia desenvolvida, quando o formicida é aplicado nos canais de carregamento de vegetais. A aplicação do formicida deve ser totalmente concentrada na área de terra solta, usando-se canais ali existentes.

DESENVOLVIMENTO DA COLÔNIA DE SAÚVA

Estudos anteriores da evolução da colônia de saúva *in natura* (M. AUTUORI — 1941 — Arq. Inst. Biol., São Paulo, Brasil, 12: 197-228.) demonstraram — tomando como índice de crescimento o número de “olheiros” — que o saúveiro abre em três anos cerca de mil “olheiros”. A curva de desenvolvimento obtida com esses dados, mostra que nos primeiros dezoito meses de vida a colônia desenvolve-se lentamente.

O número de “olheiros”, no fim desse período (primeiro período de desenvolvimento) é de cerca de vinte. Nos dezoito meses seguintes esse número alcança um total que se aproxima de mil. Tomemos como exemplo os dados referentes ao formigueiro n.º 80f., uma das colônias cujo desenvolvimento, no campo experimental, foi acompanhado desde sua fundação (M. AUTUORI, 1. c.). A “rainha” que fundou essa colônia penetrou no solo em novembro de 1938. O canal aberto e, logo em seguida obstruído pela “rainha”, foi reaberto pelas primeiras formigas adultas criadas nessa colônia, vindo a constituir o primeiro “olheiro”. Até março do ano seguinte a colônia continuou apresentando esse único “olheiro”. Em abril registramos a abertura de outros três e em maio, junho e julho foram abertos mais um, oito e quatro “olheiros”, respectivamente. Em julho de 1939 a colônia, com um total de dezessete “olheiros”, contava dezoito meses de idade e completou o que poderíamos chamar *primeiro período do desenvolvimento*. Daí por diante, o número de “olheiros” aumentou rapidamente (tabela 1).

Examinando-se os totais da tabela 1, vê-se que em outubro de 1939 a colônia já contava 53 “olheiros”, isto é, número três vezes maior do que havia três meses antes. Nessa ocasião a quantidade de terra retirada do subsolo para escavação desses 53 canais e de várias “painelas”, começava a ser apreciável e, seu acúmulo na superfície já iniciava o característico monte de terra fôfa que denuncia

a presença dos sauveiros. Passados mais dois ou três meses o número de “olheiros” ultrapassa de muito a cifra de 200 e daí em diante, o monte de terra fôfa, perfeitamente formado, não deixava mais dúvida quanto à presença de uma bem desenvolvida colônia de saúva.

TABELA 1
Segundo período de desenvolvimento da colônia de saúva

MÊS	ANO	Número de “olheiros”	
		Parcelas	Totais
Agosto	1939	7	24
Setembro		4	28
Outubro		25	53
Novembro		47	100
Dezembro		32	132
Janeiro	1940	108	240
Fevereiro		56	296
Março		64	360
Abril		118	478
Maiο		36	514
Junho		283	797
Julho		126	923
Agosto		47	970
Setembro		44	1014
Outubro		22	1036
Novembro	1941	25	1061
Dezembro		10	1071
Janeiro		36	1106
18 meses		1106 “olheiros”	

E' fácil compreender que em áreas onde existam várias colônias de saúva desenvolvidas, o solo esteja perfurado por milhares de “olheiros” que correspondem a milhares de canais. Por êsses canais, que partem da zona central dos formigueiros e se ramificam em todas as direções, transitam as formigas em busca de vegetais. Estes, são cortados e levados para o interior das “panelas” onde servirão de substrato ao cogumelo de que toda a população do ninho se alimenta.

Nas áreas infestadas pela saúva existem colônias de todas as idades, isto é, fundadas em anos sucessivos. Assim sendo, as que ainda se encontram no primeiro período de desenvolvimento (até 18 meses de idade) não podem ser localizadas porquanto ainda nem apresentam o típico aglomerado de “olheiros” e nem, conseqüentemente, o monte característico de terra fôfa.

O reduzido grupo de “olheiros” das colônias no primeiro período de seu desenvolvimento é sempre confundido com grupos de “olheiros” de velhas colônias. Não há diferenças de ordem prática entre “olheiros” de umas e de outras. Para se destruírem colônias do primeiro período de desenvolvimento seria necessário atacar todos os “olheiros” que pertencem a todas as colônias da redondeza, o que é impraticável devido ao seu elevadíssimo número.

DEMONSTRAÇÃO DA INFESTAÇÃO RESIDUAL (1)

Em meados de 1951, planejamos e iniciamos uma experiência que nos pudesse fornecer dados positivos para a confirmação dessas nossas observações.

A experiência foi realizada nas plantações de *Eucalyptus* do Serviço Florestal da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, no horto de São Carlos, localizado nas proximidades da cidade do mesmo nome, no Estado de São Paulo. Tais plantações oferecem vantagens para o nosso fim por serem áreas grandes, homogêneas e perfeitamente delimitada, com índice relativamente elevado de infestação de saúva. Graças à perfeita organização daquele serviço, sempre pudemos ter em mãos, com segurança, todos os dados referentes às experiências ali realizadas.

O próprio sistema de plantio de *Eucalyptus* nos facilitou o bom andamento das experiências. Tais árvores são plantadas simetricamente em filas, com distâncias certas e, os agrupamentos de alguns milhares de árvores (talhões) são numerados e sempre nitidamente delimitados. As experiências de combate referiam-se sempre a determinados talhões. As turmas encarregadas da execução do serviço iniciavam o combate no começo de cada um desses talhões percorrendo áreas de 5-10 filas de árvores até ao fim do talhão, extinguindo todos os formigueiros que iam sendo encontrados nessas estreitas faixas demarcadas pelas próprias árvores. Em seguida, contavam para o lado outras tantas linhas de árvores e retornavam por essa nova faixa. Repetia-se êsse trabalho, em vai-e-vem, até chegar ao término do talhão, passando em seguida para outro onde se procedia da mesma maneira.

Todos os formigueiros eram numerados com uma estaca fincada na zona de terra fôfa da colônia e de cada uma tomavam-se as seguintes anotações: número da colônia; número do talhão; data do combate; espécie da formiga; dimensões do ninho (área da terra

(1) Esta experiência contou com a estreita colaboração do Eng. Agr. Jayme V. Pinheiro, Entomologista do Serviço Florestal da Companhia Paulista de Estradas de Ferro.

fôfa) e todos os dados referentes ao combate propriamente dito, tais como: qualidade e quantidade do formicida; tempo gasto; número de operários, etc. As fichas correspondentes a cada colônia eram assinadas pelo responsável da turma de trabalhadores.

O hórto de São Carlos ocupa uma área de 1.123,47 hectares, divididos em 80 talhões e está inteiramente plantado com *Eucalyptus*. Aí executamos, de acôrdo com o método acima descrito, um combate geral à fôrminga saúva. O número total das colônias extintas foi 944.

Passados 6 meses, a contar do término do combate, procedeu-se a uma verificação em toda a área do hórto, anotando as colônias de saúva que, nessa ocasião, podiam ser localizadas por haverem completado ou ultrapassado o seu primeiro período de desenvolvimento. Verificamos que 105 sauveiros já estavam em franco desenvolvimento.

Resolvemos, afim de poder verificar a expansão do que chamamos “infestação residual”, escolher 15 talhões onde os sauveiros se desenvolveriam livremente.

Os talhões escolhidos foram os de número: 4; 7; 12; 15; 22; 26; 28; 34; 36; 50; 53; 60; 61; 75 e 78. Nos restantes 65 talhões as colônias de saúva iam sendo extintas à medida que alcançavam um desenvolvimento tal que permitisse serem facilmente localizadas.

As verificações nos 15 talhões testemunhas tiveram intervalos de 6 meses e os resultados foram os seguintes: (tabela 2).

TABELA 2

Resultado das verificações, com intervalos de 6 meses nos 15 talhões testemunhas.

Numeração dos talhões	Número das colônias antes do combate	1. ^a verificação após 6 meses. Número de colônias	2. ^a verificação após 12 meses. Número de colônias	3. ^a verificação após 18 meses. Número de colônias
4	13	2	2	4
7	19	0	0	5
12	11	0	0	6
15	1	0	0	2
22	0	0	0	2
26	53	4	10	23
28	11	0	6	12
34	0	0	0	1
46	35	1	5	21
50	4	0	2	1
53	31	6	2	6
60	36	6	6	8
61	14	2	0	1
75	13	3	7	8
78	53	5	6	43
15 talhões .	294	29	44	143

Pelos números da tabela 2, verifica-se que nêsses 15 talhões, na ocasião do combate, foram encontradas 294 colônias *que foram todas extintas*. Passados 6 meses, nêsses mesmos talhões foram localizadas 29 colônias (10% da infestação inicial). Após mais 6 meses êsse total aumentou para 44 (15%) e finalmente na última verificação, 18 meses após (a contar do combate) o número de colônias de saúva era de 143 (49%).

As verificações, passados 18 meses foram suspensas, porquanto fôra nossa intenção verificar apenas o desenvolvimento das colônias de saúva que, na ocasião do combate, já estavam instaladas no terreno. Depois daquele período de tempo iríamos encontrar, já no seu segundo período de desenvolvimento e portanto facilmente localizáveis, colônias fundadas após o término do combate, isto é, colônias fundadas por “rainhas” vindas de fóra da área, por ocasião do vôo nupcial, em fins de 1951.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta experiência podemos concluir que em áreas relativamente extensas, o combate por mais completo e eficiente que seja, não livra essas áreas da saúva pelo menor prazo que seja. A impossibilidade de se atacarem *todos* os “olheiros” existentes numa determinada área, favorece a sobrevivência de tôdas as colônias que ainda se achem no seu primeiro período de desenvolvimento.

Assim sendo, as áreas onde se pretende manter baixo o índice de infestação da saúva, deverão ser periodicamente percorridas, com intervalos de alguns meses (3-6) e, à medida que as colônias forem denunciando sua localização pelo acúmulo característico de terra fôfa, deverão ser extintas.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE SAUVA (ATTA SPP. — HYMENOPTERA-FORMICIDAE) VI — RESIDUAL INFESTATION OF THE SAUVA

A b s t r a c t

The persistence of the Sauva population on areas from which all the colonies of this leaf-cutting ant had apparently been eliminated, is called in the author's previous papers "Residual Infestation". In this paper its meaning is discussed and the experiment planned to demonstrate it is described.

The planning of the experiment was based on the knowledge of the development curve of the Sauva colony (M. Autuori — 1941 — *Arq. Inst. Biol., São Paulo, Brasil*, 12: 197-228). This curve demonstrates that from the foundation of the nest 36 months are required for the production of the first winged forms (First Nuptial Flight). During the first 18 months (1st period) the increase of the colony is small. Only about 10-20 entrances are to be seen on the terrain, whereas during the following period of 18 months there are opened about 1.000 entrances.

In the first period of its development, the colony can not be easily spotted because the characteristic loose soil resulting from the excavation of the nest has not yet been heaped on the surface. This soil heap is clearly visible after the first period of development i. e., 22-24 months. There is practically no difference of aspect between the entrances of new and old colonies.

On the foraging grounds in areas containing even few Sauva-nests there are thousands of crater-like entrances in every direction and connected to the colonies by underground channels. These channels are used by the ants for the transportation of plant parts which form the substrate of the fungus cultures.

In order to eradicate a Sauva colony the formicide should be applied through those entrances on the soil heap which are used for the transportation of soil. Application of insecticides through channels used for the transportation of plant parts should be avoided.

The experiment was carried out in the 80 plots of an *Eucalyptus* plantation. All the 944 nests were extinguished without consideration of the operational cost. Six months later an inspection was made and a total of 105 colonies were found in all the plots which had been overlooked in the first treatment. They had reached their first period of development and could thus be seen and counted.

From 65 *Eucalyptus* plots the previously overlooked ant colonies were eradicated as they became visible. In the 15 remaining plots in which 294 colonies had been killed the living 29 colonies (10 percent of the initial infestation) were allowed to undergo their normal growth. Six months later this total increased to 44 (15 percent) and finally 6 months after this the number reached 143 (49 percent). No further inspections were made since all the residual colonies had attained the first phase of their development. Following this colonies in their second development pe-

riod which were founded by queens coming from the adjoining areas would be found mingled with those considered in this experiment.

According to the data obtained in the experiment we conclude that regardless of the effectiveness of the control methods it is impossible to rid relatively extensive areas of the Sauva infestation. The practical impossibility of attacking all of the nest entrances favors the survival of the colonies still in their first period of development. The areas where the infestation is to be kept low, must therefore be inspected at regular intervals (3 to 6 months) and the nests killed as soon as they show their characteristic loose soil heap.



ESTUDOS SÔBRE AS MIRIANGIALES

IX. ELSINOE SÔBRE CARVALHO (*QUERCUS SPP.*) (1)

POR

Anna E. Jenkins⁽²⁾, A. A. Bitancourt e G. Goidanich^(3,4)

Da International Cooperation Administration, Washington D. C., Instituto
 Biológico de S. Paulo e Istituto di Patologia vegetale dell'Università di
 Bologna, Italia.

Com as estampas 16 e 17

O presente trabalho trata da taxonomia de fungos do gênero *Elsinoë* até hoje encontrados sôbre diversas espécies de *Quercus* (carvalho). Os especímenes que serviram de base para este estudo são provenientes dos Estados Unidos, Italia e Japão. A espécie de *Elsinoë* sôbre *Q. falcata* MICHX. foi tratada separadamente pelo nosso colega Dr. JULIAN H. MILLER (1957) e não será portanto considerada no presente trabalho.

Elsinoë quercus-ilicis (ARN.) comb. nov. JENKINS & GOIDANICH
Uleomyces (*Elsinoë*) *querci ilicis* ARN.

Ann. Sci. Nat., Bot. 7:687, 1925. Pl. IV, A-F.

Est. A-F (D, segundo ARNAUD 1925, Pl. IV, F)

E' a seguinte a descrição deste fungo por ARNAUD:

"Champignon développé à la face supérieure des feuilles sur des taches de 2 à 5 millimètres, brun clair en général, plus foncées à la périphérie. Ascostroma dispersés, arrondis ou allongés, placés sous la cuticule, qu'ils soulèvent en forme de coussinets aplatis, d'un noir brillant à loupe, de dimensions variables (ascostroma arrondis: environ 100 μ de diamètre; ascostroma allongés: jusqu'à 400 μ de long); au microscope, vue par transparence, la couleur des ascostromas est beaucoup plus claire; les asques se voient à travers sous l'apparence de taches circulaires plus claires. Tissu du stroma homogène, les cellules de la partie supérieure étant un peu plus grandes et à paroi colorée en brun. — Asques placés à peu près au même niveau (par suite du peu d'épaisseur du stroma), globuleux ou un peu ovoïdes, d'environ 22 μ de diamètre, probablement à huit spores. Ascospores hyalines, d'environ 15 $\times$ 6,5 μ , présentant d'abord trois cloisons transversales, puis tardivement des cloisons longitudinales".

(1) Uma contribuição dentro do programa de Assistência Técnica em operação no Brasil, sob a administração conjunta dos governos do Brasil e dos Estados Unidos. Para os Estados Unidos o programa é administrado pela International Cooperation Administration (ICA), através do Institute of Inter-American Affairs.

(2) Dra. Anna E. Jenkins, Micologista, está destacada no Technical Assistance Program, no Brasil. Pertencia anteriormente ao U. S. Department of Agriculture.

(3) Dr. Goidanich é diretor do Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Bologna.

(4) Desejamos consignar os nossos agradecimentos a nosso colega G. Arnaud em cujo herbário o segundo autor teve o privilegio de examinar (1947) o material tipo de *Uleomyces* (*Elsinoë*) *quercus-ilicis* Arn., assim como a S. Katsuki, A. S. Muller e M. J. Thirumalachar pela contribuição que fizeram de especímenes aqui citados. Somos gratos igualmente a Dom Rento José Pickel que gentilmente traduziu para o latim a diagnose da nova espécie.

O espécimen tipo desta espécie é citado por ARNAUD como segue: Sôbre a face superior de fôlhas caídas no chão de *Quercus ilex* L., “bois de la Colombière”, Montpellier, Hérault, França, 25 de Maio de 1909, G. ARNAUD (Herb. G. A.).

Conforme explica ARNAUD, a sua nova Miriangiale achava-se em velhas manchas de *Cycloconium querci ilicis* (PEGL.) ARN. (ARNAUD 1925, p. 687). O *Cycloconium*, de acôrdo com seu comentário, é comum em fôlhas vivas de *Quercus ilex*.

Em 1947, e de novo em 1949, o terceiro autor descobriu a Miriangiale, sempre em associação com o *Cycloconium*, em fôlhas vivas de *Quercus ilex* em Castelgandolfo, perto de Roma, Italia. Em alguns casos foi possível distinguir pequenas manchas epifilas, com centro claro, típicas de *Elsinoë*, por cima das manchas maiores de *Cycloconium* ou em outras partes das fôlhas, não manchadas por este fungo (Est. 16, A, E). Esta é, do nosso conhecimento, a primeira vez que se assinala a Miriangiale de ARNAUD, desde que êle a descreveu em 1925.

O nosso presente estudo deste organismo e sua classificação direta no gênero *Elsinoë* RACIBORSKI emend. JENKINS & BITANCOURT (JENKINS e BITANCOURT 1941) é baseado, em particular, sôbre um espécimen de Castelgandolfo coligido (por G. G.) em 1949. Este espécimen foi dividido em três partes e depositado em três herbários diferentes (IB 5667, IP, NFC 91029).⁵

Comparados com os ascomas descritos por ARNAUD, os que se encontram no material italiano (IB 5667) são frequentemente muito menores, medindo aproximadamente 150 μ de diâmetro, e bem mais espessos, com cerca de 80 μ de espessura, podendo portanto abrigar mais de uma camada de ascos. Eles são intraepidérmicos e não simplesmente subculares e continuam em parte cobertos com as paredes externas da epiderme do hospedeiro. O pseudoparênquima que forma a massa dos ascomas é homogêneo, como assinala ARNAUD e a coloração parda das paredes celulares pode ser observada até nas partes mais profundas do estroma, o que não é comum no gênero *Elsinoë*. Os ascomas acham-se bem delimitados dos tecidos do hospedeiro, assentados como estão sôbre o parênquima em paliçada da fôlha, repleto de goma de ferida mas de outra forma pouco alterado.

(5) Abreviações empregadas na citação dos espécimens:

HF = Herb. Florida Agr. Exp. Stat., Gainesville, Fla., Estados Unidos.

IB = Herb. Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

IP = Herb. Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Bologna.

SK = Herb. Shigetaka Katsuki.

NFC = National Fungus Collections, U. S. Dept. of Agriculture, Beltsville, Md., Estados Unidos.

Os ascosporos têm as dimensões dadas por ARNAUD mas os ascos são um pouco maiores, medindo até 30 μ de diâmetro.

Além da forma perfeita descrita por ARNAUD, encontra-se no material da Itália o que parece ser a forma conidiana (*Sphaceloma*) do mesmo fungo, pois no espécimen IB 5667 há estromas subcuticulares que permanecem, ou ainda estão, cobertos da espessa cutícula do hospedeiro e que são feitos de um pseudoparênquima com células externas alongadas no sentido perpendicular à superfície da fôlha e aparentando portanto uma paliçada de conidióforos, ao passo que as células mais profundas são isodiamétricas. Como nos ascomas, esse pseudoparênquima têm paredes celulares escuras, mesmo nas camadas mais profundas. (Est. 16, F.).

O *Elsinoë* sôbre *Quercus nigra* dos Estados Unidos (Florida) distingue-se claramente de *E. quercus-ilicis* e é aqui descrito como uma nova espécie.

Elsinoë quercicola sp. nov. BITANCOURT & JENKINS

Estampa 17

Manchas das fôlhas anfigenas, pequenas, com 0,5 a 1 mm de diâmetro, esparsas ou mais numerosas em certas partes da fôlha, principalmente dos dois lados da nervura principal e das nervuras secundárias, frequentemente coalescentes ou reunidas por extensas areas necrosadas e formando grandes manchas irregulares. Na face superior as manchas são arredondadas, irregulares ou angulosas por se acharem limitadas pelas nervuras terciárias, com margem estreita e levemente saliente, de côr parda (*Mikado brown*)⁶ ou parda escura (*bone brown* ou mais escuro) e centro de côr branca suja, devido à seca e esvasiamento das células do hospedeiro. Em muitas manchas distingue-se a presença de um pigmento avermelhado que dá uma côr parda clara (*vinaceous fawn*) ao centro da mancha e tinge levemente os tecidos verdes da fôlha em torno da mancha. Na face inferior as manchas têm as mesmas colorações porém mais baças que na face superior.

Frutificações do fungo causal visíveis com uma lupa na parte central das lesões como pequenas pontuações pardas ou pretas, às vezes muito salientes. Ascomas intraepidérmicos irrompentes, porém permanecendo cobertos com os restos das paredes externas das células epidérmicas, feitos de um pseudoparênquima de células pequenas e hialinas, com mais ou menos 2 μ de diâmetro, na parte central e profunda e células maiores, alcançando 6 μ de diâmetro que formam um epitécio de 2 a 3 camadas celulares na parte externa; o pseudo-parênquima continua-se internamente por um plectênquima hialino que se imiscui entre e dentro das células profundamente alteradas do mesófilo; os ascomas medem 80-150 $\times$ 40-70 μ ou são maiores por coalescência. Ascospores distribuídos numa só

(6) As cores são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês é baseada em Ridgway (1912).

camada irregular, globosos, medindo 15 a 20 μ de diâmetro, contendo até 8 ascoporos hialinos, munidos de 2 a 3 septos transversais, com as duas células superiores mais largas e mais curtas que as inferiores, medindo 12-14 $\times$ 6 μ .

Na vizinhança ou mesmo concrecentes com os ascomas há espermogonios feitos de uma massa arredondada ou irregular de pseudoparênquima escuro, de células isodiamétricas que medem aproximadamente 5 μ de diâmetro e que se desintegram na parte central e na superfície onde se formam um ou dois pseudo-ostiolos, deixando em liberdade o seu conteúdo de espermacias hialinas de que se formam várias em cada célula. Os espermogonios medem de 15 a 60 μ de diâmetro e as espermacias aproximadamente 2 $\times$ 1 μ .

Maculis in foliis amphigenis, sparsis vel secus nervos coalescentibus, rotundatis vel irregularibus, margine angusto brunneo vel brunneo-obscuro cinctis, in centrali parte sordide albidis, 0,5 - 1 mm latis.

Ascomatibus intraepidermalibus erumpentibus, basi e pseudoparenchymate hyalino constitutis, epithecio obscuro tectis, plectenchymate hyalino repletis, et inter cellulas corruptas mesophylli intertexto, 80-150 $\times$ 40-70 μ magnis. Ascis globosis, 15-20 μ latis, usque octosporis, hyalino, 2-3 septatis, 12-14 $\times$ 6 μ magnis.

In foliis Quercus nigrae L., Floridae, Americae Septentrionalis.

Sobre folhas vivas de carvalho aquático, *Quercus nigra* L. (Fagaceas), Florida, Estados Unidos.

Espécimen examinado: Micanopy, Florida, 20 de Maio de 1954, ALBERT S. MULLER (IB 6431, NFC 91286, ex HF, n.º F44173.).

A estrutura que aqui designamos por espermogonio (Est. 17, F,a e G - I) é, segundo parece, comparável ao chamado "estágio picnídico" assinalado em relação ao crescimento de *Elsinoë cinnamomi* em cultura pura (LIMBER, POLLACK e JENKINS, 1946, p. 468, Fig. 1, E, F).

Conforme mostra a descrição de *Elsinoë quercicola* os ascomas, ascos e ascoporos desta espécie são sensivelmente menores que os de *E. quercus-ilicis*. Nesta última espécie o ascoma é, como vimos, bem delimitado dos tecidos do hospedeiro, o que não se verifica com *E. quercicola*. Uma terceira diferença notável entre as duas espécies reside no seu efeito sobre o hospedeiro. *E. quercicola*, de fato, produz uma mancha que provem de uma necrose dos tecidos de toda a espessura da folha, resultando uma mancha anfigena. Pelo contrário, *E. quercus-ilicis*, até o presente, tem sido observado quase sempre com *Cycloconium querci ilicis* e é comparativamente superficial, na face superior da folha.

Outros *Quercus* hospedeiros de *Elsinoë*

A pequena mancha da folha que se observa em 4 outros espécimens micológicos de *Quercus* estudados corresponde à de *Elsinoë quercicola* pelo fato de interessar igualmente toda a espessura da folha. Não foram encontrados ascomas nesses espécimens, porém em

dois casos foram observados acérvulos de *Sphaceloma*. Descrevemos a seguir estes 4 espécimens, como segue:

1. *Sphaceloma* sp. sôbre *Q. ilex* L., Albano, Itália, 6 de Outubro de 1953, M. J. THIRUMALACHAR (IB 6063, NFC 91273). Manchas menores, sendo raras as de mais de 0,5 mm de diâmetro, uniformemente pardas ou com centro quase preto e margem parda escura, salvo as maiores que têm centro branco sujo. Não foram encontrados ascomas e sim pequenos acérvulos intraepidérmicos, quase sempre ainda recobertos com as paredes externas da epiderme, reduzidos a uma paliçada de conidioforos escuros, intimamente aderentes entre si, feitos de uma ou duas células alongadas, sôbre uma base plectenquimática hialina, limitada a uma ou duas camadas. Medem $40-80 \times 15 \mu$. Não foram vistas conídias e sim microconídias de cerca de 1μ (Est. 16, G-I.).

2. *Sphaceloma* sp. sôbre *Q. rubra* L., Albano, Roma, Itália, 6 de Outubro de 1953, M. J. THIRUMALACHAR (IB 6064, NFC 91274). Manchas frequentemente maiores, medindo até 2 mm de diâmetro, arredondadas e com fina linha marginal sinuosa de côr muito escura contrastando com a parte central parda ou cinzenta muito clara. Não foram encontradas frutificações (Est. 16, J-K.).

3. *Sphaceloma* sp. sôbre *Q. serrata* THUNB., Monte Tara, Prefeitura de Saga, Japão, 18 de Maio de 1952, S. KATSUKI (IB 5910, NFC 91275). Manchas muito pequenas, a maioria com aproximadamente 0,25 mm de diâmetro, muito abundantes ao longo do lado inferior das nervuras secundárias onde coalescem sem perder o seu contorno arredondado, levemente salientes, especialmente na margem que é mais escura que o centro, de côr geral atijolada (*pecan brown* a *Vandyke brown*). Não foram encontrados ascomas e sim acérvulos pequenos, bem salientes, com paliçada de conidióforos curtos, hialinos ou amarelos mais ou menos escuros, sôbre uma base de pseudoparênquima bem desenvolvida. Não foram vistas conídias (Est. 16, L-P.).

4. *Sphaceloma* sp. sôbre *Q. amamiana* HATSUSCHIMA, Ilha de Amami, Prefeitura de Kagoshima, Japão, 5 de Outubro de 1954, S. KATSUKI (IB 6633, NFC 91285, ex-herb. S. K. 781). As manchas diferem das dos demais espécimens por ser maior o contraste entre a margem quase preta e o centro branco sujo e principalmente por ter este em quase todas as manchas os tecidos reduzidos à epiderme superior geralmente rasgada, com as folhas crivadas de perfurações. Não foram encontradas frutificações.

STUDIES IN THE MYRIANGIALES IX. ELSINOË ON OAK
(*QUERCUS* SPP.)

A b s t r a c t

This taxonomic paper is concerned with *Elsinoë* as represented on more or less recently collected leaf material of oak (*Quercus* spp.). This consists of two specimens on *Q. ilex* from Italy, one specimen of *Q. nigra* from Florida, and one of each *Q. serrata* and *Q. amamiana* from Japan.

The earlier specimen on *Quercus ilex* is Arnaud's *Uleomyces* (*Elsinoë*) *querci ilicis* that he found (1909) on this same host in France. This Myriangiale, definitely an *Elsinoë*, is transferred to this genus as *E. quercus-ilicis* (Arnaud) Jenkins & Goidanich. In Italy as in France, this species was present on the upper leaf surface in close association with *Cycloconium querci-ilicis*. Some individual *Elsinoë* spots were detected, however, on or apart from the *Cycloconium* spots.

Elsinoë on the specimen of *Quercus nigra* is distinct from *E. quercus-ilicis* and is described as a new species, namely, *E. quercicola* Bitancourt & Jenkins. This fungus produces abundant, small, necrotic leaf spots that are clearly visible on both sides of the leaf.

The leaf spot on the four remaining specimens, i. e. on the second specimen of *Quercus ilex*, and on the specimen of each *Q. rubra*, *Q. serrata* and *Q. amamiana*, is small and necrotic suggesting that caused by *E. quercicola*. Ascomata of *Elsinoë* are absent on this material, though acervuli of the conidial (*Sphaceloma*) stage are present on the specimens of *Q. ilex* and *Q. serrata*. Each of the four specimens is described as *Sphaceloma* sp.

BIBLIOGRAFIA

- ARNAUD, G. — 1925 — Les Astérinées. IVe partie. (Études sur la systématique des champignons pyrenomycetes). *Ann. Sci. Nat., Bot.* 7: 643-722.
- JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1941 — Revised descriptions of the genera *Elsinoë* and *Sphaceloma*. *Mycologia* 33: 338-340.
- LIMBER, D. P., POLLACK, F. G. & JENKINS, A. E. — 1946 — *Elsinoë* discovered on *Sesbania* and *Cinnamomum*. *Mycologia* 38: 463-472.
- MILLER, J. H. — 1957 — *Elsinoë* on southern red oak (*Quercus falcata*). *Mycologia*. 49. No prelo.
- RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature. 43 p. Washington, D. C.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 16

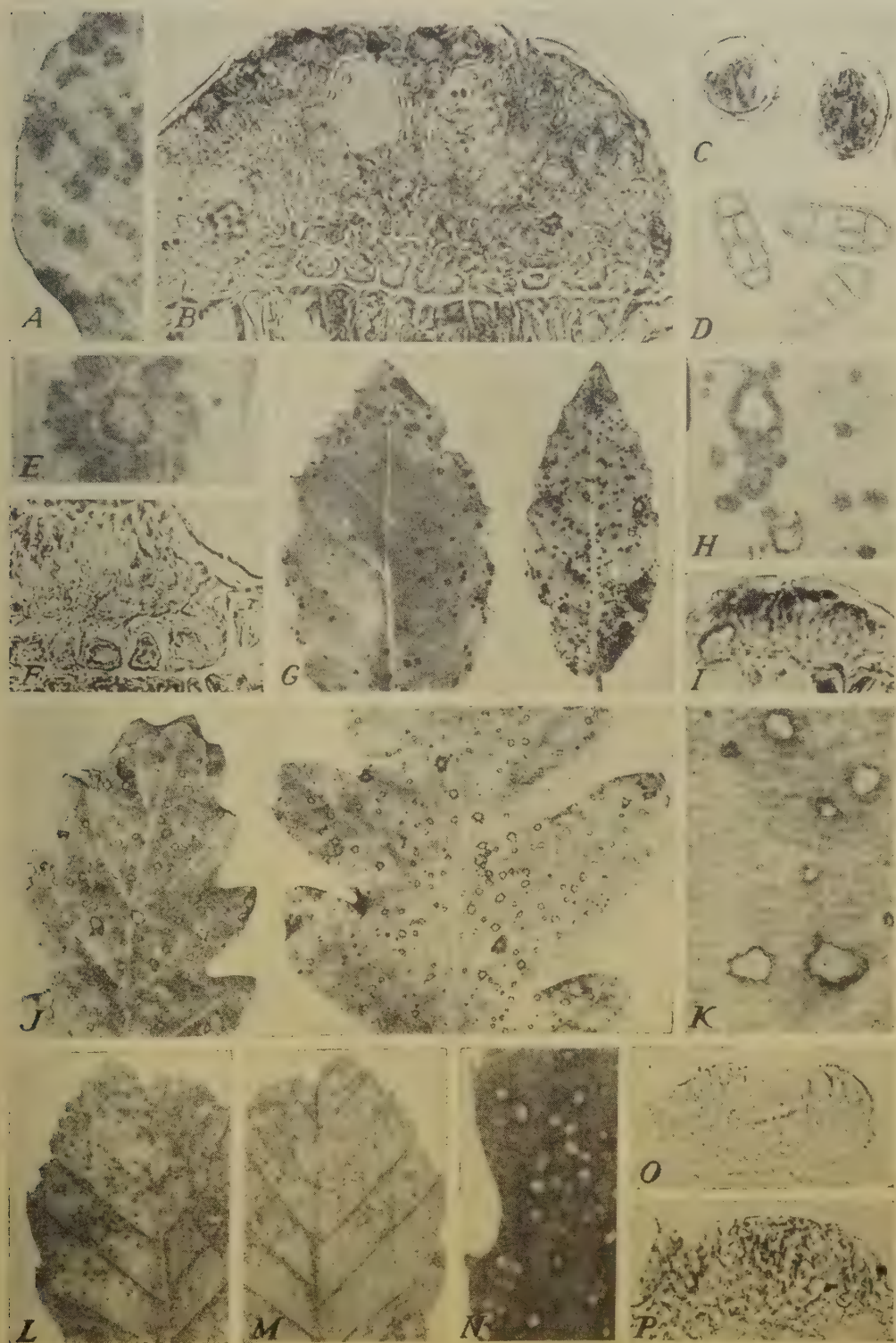
- Figs. A-F. *Elsinoë quercus-ilicis* sobre folhas de *Quercus ilex*. A, parte de uma folha de Castelgandolfo, sobre a qual se acha presente o *Elsinoë* nas manchas de *Cycloconium*, $\times 1$. B e C, seção a mão livre de um ascoma (B) e dois ascospores (C), de Castelgandolfo (IB 5667), ambos $\times 500$. D, Três ascospores, segundo Arnaud, $\times 1000$. E, mancha individual de *Cycloconium* com uma mancha de *Elsinoë* no centro, material de Castelgandolfo, $\times 3$. F, seção a mão livre de um acervulo de IB 5667, $\times 500$.
- Figs. G-I. *Sphaceloma* sp. sobre *Q. ilex*, Albano, Italia (IB 6063). G, duas folhas, face superior, $\times 1$. H, manchas das folhas, $\times 5$. I, acervulo de uma pequena mancha escura, $\times 500$.
- Figs. J-K. *Sphaceloma* sp. sobre *Q. rubra*, Albano, Itália (IB 6064). J, partes de duas folhas, face superior, $\times 1$. K, manchas das folhas, $\times 5$.
- Figs. L-P. *Sphaceloma* sp. sobre *Q. serrata*, do Japão (IB 5910). L, parte de uma folha, face superior, $\times 1$. M, face oposta da folha de L, $\times 1$. N, manchas das folhas, $\times 5$. O e P, seções a mão livre de acervulos, $\times 500$.

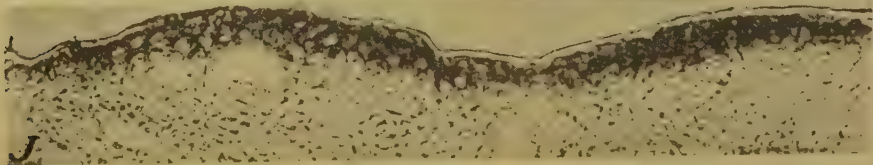
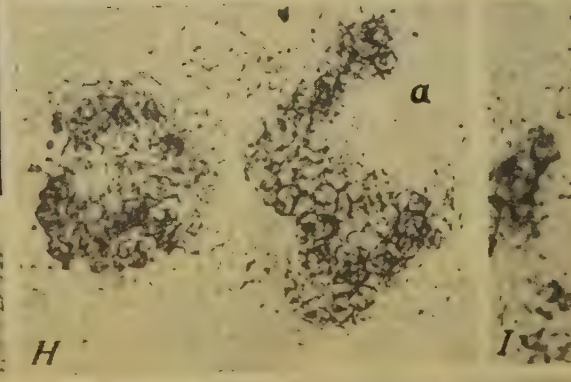
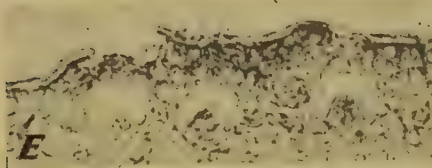
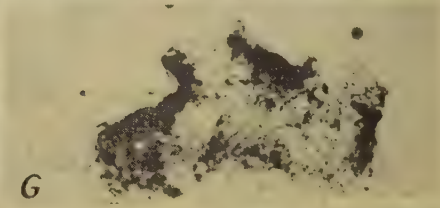
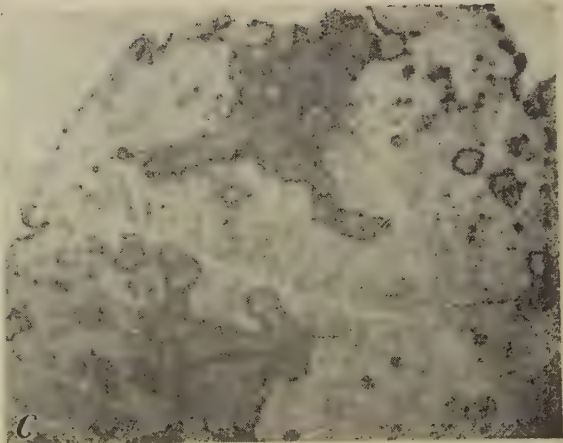
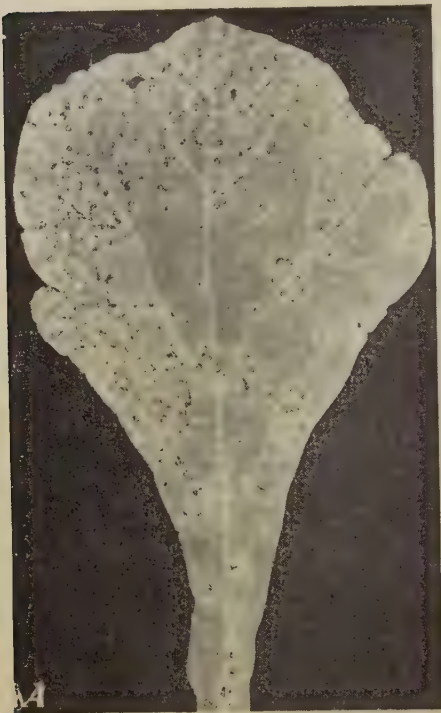
Fotografias por Goidanich (A, E), Rodrigues (G, H, J a N) e Bitancourt (B, C, F, I, O, P).

Estampa 17

- Figs. A-K *Elsinoë quercicola* sobre folhas de *Quercus nigra*, Florida (IB 6431). A, face superior, e B, face inferior da maior parte de uma folha, ambas $\times 1$. C e D, manchas das folhas, face superior, $\times 5$; as manchas em D acompanham uma nervura, algumas delas mostrando ascomas; E-F e J, seções a mão livre de ascomas; F, a, formação espermogonial, tôdas $\times 500$; G, seção a mão livre de um espermogonio, $\times 500$. H, dois espermogonios visto de cima, um deles esmagado para deixar ver as espermacias, a, $\times 500$. I, espermacias, $\times 1000$. K, dois ascospores, $\times 500$.

Fotografias por Rodrigues (A e D) e Bitancourt (E a K).





UMA DOENÇA DO TOMATEIRO EM PIEDADE, CAUSADA PELO VIRUS Y DA BATATINHA

POR

K. Silberschmidt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 18 a 21

Recebemos, em 5/3/53, por intermédio do Dr. ANDERSON ANDRADE, atualmente Chefe da Seção de Fungicidas do Instituto Biológico, tomateiros provenientes da zona de Piedade (Estado de São Paulo), apresentando sintomas, que fazem parte do quadro sintomatológico de diversas doenças do tomateiro. As folhas apicais estavam pequenas, enrugadas, com folíolos estreitos, mas não filiformes. Notavam-se no limbo (— aliás de tamanho reduzido —) das folhas novas um esclarecimento e até um engrossamento das nervuras. Segundo informações recebidas naquela ocasião, a doença era bastante disseminada nos tomates da zona de Piedade, constituindo uma ameaça para o cultivo do tomateiro naquela região.

Com o material recebido em 5/3/53 realizamos ensaios de inoculação por suco em plantas sadias das seguintes espécies indicadoras: *Nic. Tabacum*, *Nicotiana glutinosa* e *Sol. Lycopersicum* (tomate Santa Cruz). Ao mesmo tempo efetuamos também algumas enxertias de garfos doentes de tomateiros em cavalos sadios desta mesma espécie. Tendo considerado como provável que o material utilizado como fonte encerrasse ou o vírus do mosaico do pepino ou do fumo (senão ambos), ficamos surpreendidos com o resultado deste primeiro ensaio. Os tomateiros inoculados exibiram um enrugamento e retorcimento das folhas novas e um leve mosqueado, mas as folhas nem se tornaram afiladas (como acontece após a inoculação com o mosaico do pepino) nem apresentavam fortes bolhosidades (blistering), sintomas esses induzidos pelo mosaico de fumo. O que, naquela primeira experiência ainda estranhemos mais era o fato do vírus (pelo menos neste ensaio) não induzir sintomas em *Nic. Tabacum* White Burley e em *Nicotiana glutinosa*. Nas experiências subsequentes verificamos, que estas duas espécies, são, com efeito, suscetíveis ao vírus de "Piedade", apresentando porém apenas sintomas sistêmicos muito brandos e tardios.

Ficou demonstrado por estes ensaios preliminares, que o vírus em estudo provoca sintomas muito mais severos em tomateiro do que em *Nic. Tabacum* e em *Nic. glutinosa*. A elevada suscetibilidade do

tomateiro para o vírus de Piedade e a ameaça que, justamente por causa disso, esse vírus representa para as culturas do tomateiro levaram-nos a procurar referências de literatura a doenças semelhantes do tomateiro e a tentar a identificação do vírus de Piedade.

LITERATURA

As doenças de vírus do tomateiro descritas na literatura e que mais se parecem com a doença observada em Piedade, são as provocadas pelo vírus Y da batatinha.

Antes de indicar aqui alguns trabalhos, em que o tomateiro foi utilizado como uma das espécies hospedeiras experimentais do vírus Y da batatinha, queremos destacar aquelas observações de autores anteriores, que se referem a verdadeiras doenças do tomateiro no campo, provadas de serem causadas por esse vírus.

SAKIMURA K. (17,1953) chamou a atenção sobre o fato de que em Hawaii na ilha de Oahu o vírus Y da batatinha causa uma doença bem disseminada nas plantações comerciais do tomateiro. Ele chegou a identificar o vírus em testes de laboratório, mas não deu uma descrição dos sintomas da doença no campo.

No mesmo ano CONOVER R. A. e FULTON R. W. (5,1953) informaram sobre a ocorrência do vírus Y da batatinha em tomates em Florida. As plantas no campo, atacadas por esta doença, apresentavam nas folhas novas primeiramente um leve clareamento das nervuras. As folhas subsequentes exibiam uma fraca rugosidade, leve distorção e um mosqueado difuso. Numa fase mais avançada da doença, os folíolos de algumas das folhas enrolavam-se para baixo e os pecíolos apresentavam epinastia, o que dava às plantas um aspeto comparável ao do salgueiro “chorão”. Um sintoma muito conspícuo em folhas maduras consistia no aparecimento de necroses pardas ao longo de nervuras secundárias e terciárias.

Tomateiros que além do vírus Y encerravam ainda o vírus do mosaico do fumo, apresentavam sintomas muito mais severos consistindo principalmente num mosqueado amarelo, em distorção das folhas e inibição do crescimento do ponto de vegetação.

Já alguns anos antes, ALVAREZ GARCIA L. A. e ADSUAR J. (1,1943) tinham descrito uma doença de vírus de tomateiro, causada possivelmente por um complexo de vírus, dos quais uma variante do vírus Y da batatinha fazia parte. Os sintomas nas plantas do tomatal consistiam num mosqueado amarelo acompanhado de diversos grãos de distorção das folhas.

Mais recentemente MAC NEILL B. H. (14,1955) descreveu uma doença complexa do tomateiro em tomates da província de Ontario, Canadá. As plantas encerravam além de uma variante do vírus Y da batatinha geralmente ou o vírus do mosaico do fumo ou o vírus "etch" do fumo e caracterizavam-se por sintomas necróticos do tipo do "streak".

Além destes trabalhos, que se referem a doenças de tomateiro, comprovadamente causadas, pelo menos em parte, pelo vírus Y da batatinha, constam da literatura indicações relativas a numerosas outras variantes do vírus Y da batatinha que devem ser considerados agentes causadores potenciais de doenças do tomateiro.

DALE W. T. (8,1954) descreveu uma doença do pimentão, em Trinidad, caracterizada por "faixa das nervuras", doença essa causada por um vírus que nas suas propriedades físicas e no quadro sintomatológico provocado em numerosas espécies hospedeiras se parece com o vírus Y da batatinha. DALE considerou, porém, o tomateiro resistente a este vírus, o que ao nosso ver talvez apenas sob certas condições externas corresponda à realidade. Mui recentemente SIMONS J. N. (18,1956) deu uma descrição detalhada de uma doença de vírus causando "faixas das nervuras" nas folhas do pimentão no sul da Florida. É verdade que o autor desse trabalho não chega a afirmar que o agente causador da doença do pimentão é efetivamente o vírus Y da batatinha; mas em muitos pontos, as qualidades físicas do vírus causador dessa doença coincidem com as do vírus Y da batatinha. O vírus prevalecente em Florida foi provado de infeccionar experimentalmente o tomateiro e de provocar nele sintomas de clareamento das nervuras, mosqueado e de acanoamento (cupping).

Finalmente vamos nos referir aqui ainda a algumas doenças do tomateiro que possivelmente não têm relação com o vírus Y da batatinha, mas que facilmente poderiam ser confundidas com as doenças até agora mencionadas.

Em primeiro lugar deveríamos mencionar aqui uma doença do tomateiro, descrita na Itália por GIGANTE R. (12,1940). Folhas e hastes das plantas atacadas por essa doença exibem um forte arqueamento, que deve ser semelhante ao retorcimento em tomateiros infectados com o vírus de Piedade. Mas GIGANTE verificou que *Nicotiana Tabacum* e *Solanum melongena* reagem à infecção pelo agente causador da doença por sintomas locais. Em vista disso e do fato que GIGANTE não tentou chegar a uma identificação do vírus, não podemos dizer se está relacionado com o agente causador da doença de Piedade. De maneira semelhante, uma doença do tomateiro descrita na Índia sob o nome de "smalling disease" (nanismo de folhas) por

VASUDEVA R. S. and SAM RAJ J. (20,1947) lembra sob alguns aspectos a doença do tomateiro de Piedade. De acordo com os mencionados autores, os sintomas principais que aparecem na estufa em plantas inoculadas com este vírus consistem num mosqueado passageiro das folhas. A este respeito assim como a respeito das qualidades físicas in vitro, o agente causador da "smalling disease" não difere muito do vírus causador da doença do tomateiro de Piedade. Por outro lado, os autores afirmam, que na Índia a doença é transmitida pelo aleurodídeo *Bemisia Tabaci*.

A redução do tamanho das folhas — que deu o nome a "smalling disease" da Índia — constitui também um dos sintomas principais de uma doença do tomateiro do Estado de São Paulo, descrita alguns anos atrás sob o nome de "Ponta amarela" por COSTA, A. S. (6,1949). Um outro sintoma essencial dessa doença, como já o nome indica, consiste numa Clorose acentuada amarela da ponta. Na doença de Piedade observamos ocasionalmente ligeira Clorose, que, porém nunca chega a representar um sintoma muito destacado. A. S. COSTA verificou que o agente causador da doença por ele estudada é transmitido por *Myzus persicae* e *Macrosiphum solanifolium*, mas não por suco e não chegou a uma identificação deste vírus.

Muito parecidos com os sintomas da doença de tomateiro de Piedade são aqueles de uma doença da mesma espécie hospedeira, observada em Trinidad e descrita sob o nome de "tomato twisted leaf" por FERGUSON I. A. C. (10,1951). Evidentemente, nessa doença assim como na nossa doença de Piedade, as folhas novas exibem sintomas de "retorcimento das pontas". Mas mesmo assim parece que os agentes causadores das duas doenças não são idênticos, já que as espécies *Nic. glutinosa* e *Nic. Tabacum*, suscetíveis ao vírus de Piedade, mostraram-se nas experiências de FERGUSON resistentes ao agente causador da doença "tomato twisted leaf". Além disso o próprio tomateiro nos ensaios do referido autor, podia ser infeccionado apenas por enxertia, mas não por suco.

Ha ainda outra doença de tomateiro que não queremos deixar de mencionar aqui e que foi descrita originalmente por BLENCOWE I. W. and CALDWELL I. (2,1946) na Inglaterra sob o nome de "Aspermy" e posteriormente estudada na Italia por CIFERRI R. (4,1951) e nos Estados Unidos por BRIERLEY P., SMITH F. F. and DOOLITTLE S. P. (3,1953). Tomateiros afetados por essa doença apresentam um aspecto arbustivo, ficam impedidos no crescimento e exibem uma malformação da ponta de vegetação. Esses caracteres são bastante semelhantes aos da doença causada pelo vírus de Piedade. Por outro

lado, a doença "aspermy" inibe fortemente a formação de frutos e sementes do tomateiro, fenômeno esse que não observamos em tomateiros infectados com o vírus de Piedade.

PARTE EXPERIMENTAL (1)

A) Material e métodos

Na maioria dos ensaios descritos a seguir a transmissão do agente causador da doença de Piedade foi efetuada por meio de suco. Nesses ensaios uma folha das plantas a serem inoculadas foi friccionada com um suco obtido por trituração, em almofariz, de folhas de plantas doentes, com um líquido contendo por cada grama (peso fresco) de tecido triturado 0,8cc de uma solução de sulfanilamida de 0,1% e 0,2 cc de uma solução de sulfito de sódio de 0,5%. As plantas inoculadas, cultivadas em estufas à prova de insetos, foram mantidas em observação durante dois meses.

Em alguns dos ensaios utilizamo-nos também do método de enxertia. Escolhemos para essas experiências o método de garfagem lateral, método esse em que a ponta do cavalo é mantida intata.

Finalmente, conseguimos também em várias séries de ensaios transmitir o vírus por um inseto-vetor, no nosso caso o afídio *Myzus persicae*. Nestes ensaios, as plantas povoadas com os afídios (virulíferos ou não) foram cobertos por copos e guardados assim durante uma semana na estufa. Passado esse prazo, os copos foram retirados e as plantas pulverizadas com sulfato de nicotina (1 cc de solução de 40% em 800 cc de água).

B) Espécies hospedeiras do vírus de «Piedade»

1) *Sol. Lycopersicum* L.

"Seedlings" de tomateiro, da variedade Sta. Cruz, cultivados na estufa, apresentam após inoculação com o vírus de Piedade, sintomas bastante conspícuos. Cerca de 14 dias depois do friccionamento das folhas mais velhas com suco contendo o vírus de Piedade, a ponta da folha nova se curva para baixo. A folha toda apresenta um leve enrugamento e um muito leve clareamento das nervuras. Poucos dias mais tarde, algumas pontas das folhas novas começam exibindo um retorcimento ("twisting") da folha, sintoma esse que às vezes se

1) Desejo aqui agradecer a valiosa ajuda que me foi prestada em alguns dos ensaios por Dna. *Esmeralda Rostom*, então assistente desta Seção e o Sr. *Luiz Tommasi*, então Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

acentua tanto que alguns dias mais tarde a folha se apresenta enrolada em forma de cartucho. Consideramos este “retorcimento” dos folíolos como o sintoma mais característico, em tomateiro, da doença causada pelo vírus Piedade. (Estampa 18: figs. 1 e 2).

Um outro sintoma que pode servir para a diagnose de tomateiros infetados com o vírus de Piedade, consiste no encurtamento das folhas. Em consequência deste encurtamento, os folíolos em folhas de plantas doentes acham-se mais próximos um do outro do que em folhas de plantas sadias.

As folhas formadas algumas semanas depois da inoculação costumam apresentar sintomas mais brandos consistindo apenas em um leve enrolamento da ponta das folhas e um fraco enrugamento do limbo. Algumas plantas, porém, apresentam também um mosqueado das folhas novas. Em tais folhas mosqueadas as áreas claras se localizam com preferência ao longo das nervuras secundárias. Depois dos tomateiros atingirem o seu tamanho definitivo, é difícil distinguir plantas infetadas com o vírus de Piedade de plantas sadias. Observando, porém, em tais tomateiros “recuperados” as folhas mais velhas, nota-se frequentemente que nelas persiste retorcimento dos folíolos. (Estampa 19: fig. 3).

Afim de verificar, se tomateiros velhos que deixam de apresentar sintomas característicos da doença de Piedade, de fato contêm o agente causador dessa doença, basta podar os pés. Se as plantas podadas de fato estavam infetadas com o vírus da doença de Piedade, as folhas novas dos brotos laterais apresentam-se acanoadas e retorcidas.

Acompanhamos este desenvolvimento de sintomas principalmente em tomateiros da variedade Sta. Cruz, variedade essa preferida pela maioria dos produtores de tomate no Estado de São Paulo. Sabemos, porém, dos nossos ensaios executados p. e. em 1/2 e 5/2/54, que a variedade Marglobe de tomateiro e até a espécie *Solanum pimpinellifolium* (espécie taxonomicamente próxima dos nossos tomateiros cultivados) caracterizam-se por sintomas semelhantes.

A severidade dos sintomas depende, como as nossas observações demonstraram, ainda da idade em que as plantas são infetadas e das condições externas. Plantas pequenas (cerca de 10 cm de altura) apresentavam sintomas mais acentuados que pés grandes. Em semanas quentes durante os meses do verão os sintomas da doença de Piedade em tomateiros mostravam-se mascarados.

2) *Nicotiana rustica* L.

Diante do caráter extremamente brando dos sintomas induzidos pelo vírus de Piedade nas espécies *Nic. Tabacum* e *Nic. glutinosa* — fato esse já focalizado na introdução — procuramos encontrar mais algumas espécies hospedeiras experimentais que pudessem servir de “indicadoras” para esse vírus. E’ verdade, que os sintomas provocados por esse vírus em tomateiro são bastante característicos, mas não achamos prudente caracterizar uma doença apenas pelos sintomas observados em uma espécie hospedeira.

E’ por isso que incluímos em vários dos nossos ensaios diversas espécies que consideramos eventuais hospedeiras experimentais da doença causada pelo vírus de Piedade, entre as quais também plantas de *Nic. rustica*. Já 10 dias após a inoculação observamos nas folhas novas faixas levemente levantadas de cor verde carregada acompanhando alguns trechos das nervuras secundárias (“veinbanding”). Essas faixas transformaram-se mais tarde em bolhosidades (“blistering”). (Estampa 19: fig. 4).

As vezes o primeiro sintoma que se nota nas folhas novas consiste num encrespamento do limbo e às vezes essas folhas exibem também pontas e linhas necróticas.

As folhas novas, que se formam algumas semanas mais tarde, apresentam ainda uma forte malformação. Passada a fase aguda da doença, cerca de 4 meses após a inoculação, a planta passa a produzir folhas que exibem apenas um leve mosqueado.

Já que os sintomas induzidos pelo vírus de Piedade em *Nic. rustica* são bem acentuados e bastante característicos, passamos, nos nossos ensaios posteriores, fazer amplo uso desta espécie hospedeira experimental.

3) *Capsicum annum* L.

Plantinhas de pimentão (*Capsicum annum*) apresentavam uma reação muito forte ao vírus de Piedade. No ensaio de inoculação efetuado em 30-8-55 incluímos algumas plantas, ainda bastante novas, de *Capsicum annum*. Dentro de duas semanas as plantas inoculadas tinham morrido, ao passo que a planta testemunha se desenvolveu normalmente. Em ensaios posteriores, p. e. nos de 19-9-55 e 23-10-55, incluímos plantas já um pouco mais desenvolvidas de *Capsicum annum*. Nestes casos, as plantas infeccionadas com o vírus Piedade sobreviveram, apresentando porém sintomas muito acentuados. As folhas novas das plantas inoculadas duas semanas antes com

o vírus Piedade mostravam forte epinastia, acompanhada de encrespamento e mosqueado do limbo. Poucos dias mais tarde, necroses em forma de placas e linhas pretas apareceram nas folhas médias e novas, algumas das quais em seguida se destacaram da planta.

Depois dessa fase aguda, a planta se restabeleceu, mas mesmo as folhas formadas nesta fase crônica continuaram exibindo faixas escuras acompanhando as nervuras (“veinbanding”), bolhosidades (“blistering”) e um forte encrespamento do limbo. (Estampa 20: fig. 5).

Além disso, todas as plantas infeccionadas com o vírus de Piedade caracterizavam-se por um forte nanismo.

Os sintomas que acabamos de descrever e que observamos em plantas de *Capsicum annuum* infeccionadas com o vírus de Piedade, lembram bastante aqueles considerados por COSTA A. S. e ALVES S. (7, 1950) característicos do “Mosaico do pimentão”. Entretanto, os sintomas do “Mosaico do pimentão” parecem um pouco mais brandos o que talvez possa ser explicado pela hipótese de que os citados autores tenham trabalhado com outra variante do vírus Y da batatinha.

4) *Solanum ciliatum* Lam.

As folhas novas, formadas após a inoculação de plantas pequenas de *Solanum ciliatum* com o vírus de Piedade, apresentam forte deformação. As nervuras secundárias, que em folhas sadias partem de diversos pontos da nervura central, têm em folhas doentes o seu ponto de partida na base do limbo, dando à folha o aspeto de um “leque”. (Estampa 20: fig. 6). Além disso, algumas áreas do limbo sobressaem em forma de bolhosidades (“blistering”).

5) *Nic. Tabacum* L. White Burley.

Plantas desta espécie que duas até 4 semanas antes tinham sido inoculadas com o vírus de Piedade, apresentavam nas suas folhas novas um leve mosqueado (sem encrespamento) e traços de “veinbanding”. Na folha inoculada notam-se ocasionalmente leves pintas amarelas. Mesmo mantendo tais plantas de fumo W. B., encerrando o vírus de Piedade, durante meses em observação, não pudemos notar um agravamento dos sintomas. Em tais plantas as folhas novas ficam lisas como em plantas sadias e só alguns trechos muito esparsos das ramificações laterais das nervuras secundárias (perto do bordo do limbo) estão acompanhados por faixas, pouco acentuadas, de cor levemente mais escura (“veinbanding” marginal). (Estampa 21: fig. 7).

6) *Nic. glutinosa* L.

Os sintomas induzidos pelo vírus de Piedade em *Nic. glutinosa* são muito brandos, podem, porém, ser considerados diferenciais. Outras variantes do vírus Y da batatinha provocam frequentemente em *Nic. glutinosa* um enrugamento e encrespamento acentuado das folhas novas. Geralmente, este encrespamento está combinado com um mosqueado, resultando de um “veinbanding” interessando a totalidade das nervuras secundárias e terciárias. Em plantas de *Nic. glutinosa*, encerrando o vírus de Piedade, falta completamente o sintoma de mosqueado e a formação de faixas escuras é limitada a poucos trechos das nervuras secundárias. Esses trechos se destacam menos pela cor intensamente verde do que por um brilho contrastando com o aspecto mais mate do resto do limbo e que faz sobressair tais trechos como se eles formassem bolhosidades (“blistering”). Além desse sintoma, observa-se apenas às vezes um leve retorcimento dos bordos das folhas para baixo.

7) *Physalis floridana* Rybd.

Observa-se um leve mosqueado e enrugamento nas folhas novas de plantas de *Physalis floridana* inoculadas com o vírus de Piedade. Com o suco de plantas desta espécie, que apresentavam mosqueado em consequência da inoculação com o vírus de Piedade, conseguimos, no ensaio de 22/1/54, induzir sintomas típicos (da doença causada pelo vírus de Piedade) em plantas novas de tomateiro.

Também os sintomas induzidos nesta espécie pelo vírus de Piedade são característicos apenas dessa variante do vírus Y da batatinha, porque as outras variantes desse vírus, pelo menos as por nós estudadas, provocam um mosqueado mais forte e ainda um enrolamento e enrugamento das folhas.

8) *Saracha jaltomata* Schlecht.

Plantas dessa espécie, inoculadas com suco contendo o vírus de Piedade, apresentam apenas leves sintomas sistêmicos consistindo num clareamento das nervuras e num ligeiro enrugamento das folhas novas. Nos nossos ensaios os sintomas descritos manifestavam-se cerca de um mês após a inoculação.

9) *Solanum tuberosum* L.

Já que as observações descritas neste trabalho nos levaram a admitir que o vírus causador da doença de tomateiro em Piedade pertence ao grupo do vírus Y da batatinha, achamos de grande interesse estudar a reação de um número relativamente extenso de variedades de *Solanum tuberosum* a este vírus.

Os nossos ensaios com essa espécie dividem-se em dois grupos, compreendendo o primeiro grupo as experiências realizadas com plantas cultivadas de tubérculos, ao passo que o segundo consiste de testes com "seedlings".

Nas experiências efetuadas com plantas cultivadas de tubérculos o nosso procedimento geral foi o seguinte:

Antes de inocular as plantas, que foram cultivadas em vasos dentro de estufas à prova de insetos, com vírus de Piedade, realizamos testes para averiguar, se as plantas a serem inoculadas estavam livres de vírus transmissíveis por suco. Com este fim preparamos das folhas novas de cada pé de batatinha um suco que friccionamos sobre folhas de plantas sadias de espécies indicadoras do vírus Y e X da batatinha; como espécies indicadoras usamos principalmente *Nicotiana Tabacum* var. White Burley e *Nicotiana glutinosa*.

Com o vírus Piedade inoculamos só aquelas plantas de batatinha, que nos testes preliminares foram provadas de não encerrarem vírus X ou Y da batatinha.

A inoculação das batatinhas de diversas variedades, cultivadas a partir de tubérculos, com o vírus de Piedade foi efetuada por suco ou por enxertia. Garfos de tomateiros contendo o vírus de Piedade pegaram facilmente sobre cavalos de batatinha e as combinações de enxertias ficaram vivas durante meses. Durante este prazo as plantas foram mantidas em observação e quaisquer anomalias, verificadas nas batatinhas inoculadas ou enxertadas, foram anotadas nos nossos protocolos.

Além disso, submetemos as plantas exibindo anomalias que consideramos eventuais sintomas causados pelo vírus de Piedade, a novos testes, (tab. I, rubr. 5) comparáveis aos ensaios preliminares: Inoculamos com suco de folhas de cada pé de batatinha, suspeito de encerrar vírus, grupos de plantas sadias de *Nicotiana Tabacum*, *Nic. glutinosa* e de *Solanum lycopersicum*, que serviram de espécies indicadoras.

Finalmente colhemos os tubérculos dos pés de batatinha inoculados com o vírus Piedade para planta-los em vasos. Isso nos deu a oportunidade de estudar o efeito da inoculação em plantas da

segunda geração vegetativa. Alguns destes últimos ensaios estão ainda em andamento. Resumindo todas as experiências de inoculação de batatinhas, cultivadas a partir de tubérculos, com o vírus de Piedade podemos dizer, que em nenhum caso, nem nas plantas inoculadas com suco nem naquelas enxertadas com garfos de tomateiros doentes, pudemos provar a existência de vírus de Piedade. Em nenhuma das plantas observamos sintomas característicos da infecção pelo vírus Y. Os ensaios relativos à inoculação de batatinhas, cultivadas a partir de tubérculos, com o vírus Piedade acham-se reunidas em Tabela I.

TABELA I

Resultados de experiências de inoculação com batatinhas cultivadas a partir de tubérculos

Data início ensaios	VARIEDADE	Tipo de inoculação	N.º de pl. inoculadas	N.º de pl. testadas	Resultado
23/ 8/1955	Allerfrüheste Gelbe	Suco	4		neg.
23/ 9/1955	Batata Italiana (variedade desconhecida)	Suco	4		neg.
27/ 9/1955	Mittelfrühe	Suco	3	1	neg.
29/11/1955	Bintje	Enxertia	4		neg.
12/12/1955	Eigenheimer	Enxertia	5	4 (x)	neg.
21/ 2/1956	Voran	Enxertia	4	1	neg.

(x) Uma das plantas enxertadas foi submetida, sempre com resultado negativo, a 3 testes subsequentes.

Passando agora para a descrição dos testes de inoculação com o vírus Piedade que realizamos com “seedlings” de batatinha, basta esclarecer que nestes testes pudemos seguir um procedimento mais simples.

Uma vez que os casos, em que vírus de batatinha é transmitido por sementes botânicas, são extremamente raros, dispensamos nas experiências com “seedlings” cultivados em estufa a partir de sementes verdadeiras, os testes preliminares que servem para verificar se as plantas antes da inoculação estavam livres de vírus. Além disso, nos ensaios com “seedlings” que geralmente crescem devagar e custam para alcançar um bom tamanho, fizemos pouco uso do método de enxertia para efetuar as inoculações. Preferimos inocular os “seedlings” ou por suco ou por meio de afídio *Myzus persicae* que é, como será exposto em capítulo posterior, um inseto-vetor do vírus

de Piedade. A técnica que empregamos nos ensaios de transmissão do vírus de Piedade por insetos será também exposta nesse mesmo capítulo.

Aqui queremos apenas mencionar que tanto nas inoculações feitas por suco como naquelas efetuadas por insetos submetemos geralmente ao teste, além dos “seedlings” de batatinha, representantes de outras espécies de plantas, principalmente de *Nicotiana Tabacum* White Burley, e de *Solanum Lycopersicum*. Salvo poucas exceções, esses testes em espécies suscetíveis ao vírus Y da batatinha geralmente deram resultados positivos, indicando que as fontes utilizadas para infeccionar os “seedlings” de batatinha, de fato encerravam o vírus de Piedade.

Todos os “seedlings” de batatinha, que após inoculação com o vírus de Piedade apresentavam sintomas suspeitos de uma doença de vírus, forneceram material para novos testes de inoculação em espécies indicadoras. O número de “seedlings” testados por ensaio está indicado em rubr. 6 da Tab. II.

A realização das experiências com “seedlings” de batatinha tornou-se possível pela gentileza, com que os especialistas mencionados a seguir, nos enviaram a pedido, amostras de sementes de batatinha. Reconhecendo o grande valor dessa colaboração, queremos agradecer o recebimento dos seguintes materiais:

1) 5 amostras de sementes (entre outras variedades: Aquila, Gaucha, Petrolini e Rosa Nova) do Snr. Eng. Agr. FLORIANO GUIMARÃES, Estação Experimental de Horticultura Domingos Petrolini, Rio Grande, Rio Grande do Sul.

2) 6 amostras de sementes, seguidas mais tarde de 17 outras, de produtos de autofecundação de variedades alemãs de batatinha, do Snr. Regierungsrat R. BERCKS, Institut für Virusserologie der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Braunschweig, Alemanha.

A esse sortimento pertenceram amostras de sementes das variedades Bona, Ackersegen, Olympia e Carmen, consideradas por Dr. BERCKS suscetíveis ao vírus Y da batatinha.

3) 11 amostras de sementes de híbridos entre diversas variedades americanas de batatinha e duas seleções de *Solanum demissum*, espécie indicadora consagrada na literatura para a caracterização do vírus Y, do Prof. R. W. HOUGAS, Genetics Department, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

Os resultados, obtidos nos ensaios com “seedlings” de batatinha acham-se reunidos em Tabela II.

TABELA II

Resultados de experiências de inoculação de «seedlings» de batatinha com o vírus de Piedade

Data início ensaios	Variedade	Tipo inoc.	Origem sement. batat.	N.º seedl. inoc.	N.º seedl. testad.	Res. com seedl. batatinha
21-12-55	Rosa Nova	suco	Guim.	4		neg.
21-12-55	Gaucha	suco	Guim.	4	1	neg.
21-12-55	Seedl. X 753	suco	Guim.	4		neg.
4- 1-56	Aquila	ins.	Guim.	10	2	neg.
4- 1-56	Petrolini	ins.	Guim.	8	2	neg.
16- 2-56	Rosa Nova	suco	Guim.	4		neg.
12- 3-56	Ackersegen	suco	Bercks	3	1	neg.
13- 3-56	Ackersegen	ins.	Bercks	10	1	neg.
20- 3-56	Bona	ins.	Bercks	4	1	neg.
20- 3-56	Olympia	ins.	Bercks	4	3	neg.
26- 3-56	Ackersegen	suco	Bercks	6	1	neg.
18- 4-56	Ackersegen	suco	Bercks	4		neg.
18- 4-56	Calrose X Katahd.	suco	Houg.	4	2	neg.
20- 4-56	Calrose X Katahd.	ins.	Houg.	4	1	neg.
20- 4-56	Canso X Katahdin	ins.	Houg.	4	1	neg.
26- 4-56	Canso X Katahdin	suco	Houg.	4	1	neg.
2- 5-56	Sol. demiss. P. I. 230529	suco	Houg.	3		neg.
26- 6-56	Carmen	suco	Bercks	4	1	neg.
26- 6-56	Flava	suco	Bercks	4		neg.
26- 6-56	Sol. demiss. P. I. 175.404	suco	Houg.	4		pos.
26- 6-56	Earlaine X Katahd.	suco	Houg.	4		neg.
26- 6-56	Glemmeer X Katahd.	suco	Houg.	4	1	neg.
26- 6-56	Green Mount. X Kat.	suco	Houg.	4	2	neg.
26- 6-56	Marygold X Katahd.	suco	Houg.	4		neg.
26- 6-56	Russ. Seb. X Katah.	suco	Houg.	4		neg.
26- 6-56	Sebago X Katahd.	suco	Houg.	4	1	neg.
26- 6-56	Seed. 927-3 X Kat.	suco	Houg.	4		neg.
26- 6-56	Erie X Katahd.	suco	Houg.	4	1	neg.
26- 6-56	Essex X Katahd.	suco	Houg.	4	1	neg.
3- 7-56	Carmen	ins.	Bercks	2		neg.
3- 7-56	Flava	ins.	Bercks	2	1	neg.
3- 7-56	Sol. demiss. X Kat.	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Earlaine X Katah.	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Erie X Katahdin	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Essex X Katahdin	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Glemmeer X Katah.	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Green Mount. X Kat.	ins.	Houg.	2	1	neg.
3- 7-56	Marygold X Katahd.	ins.	Houg.	2	1	neg.
3- 7-56	Russ. Seb. X Katah.	ins.	Houg.	2		neg.
3- 7-56	Seed. 927-3 X Kat.	ins.	Houg.	2	1	neg.

Como se pode ver desta tabela, não conseguimos induzir em nenhum dos nossos ensaios, sintomas sistêmicos característicos em nenhum dos “seedlings” de batatinha por nós inoculados com o vírus Piedade. Na seleção P. I. 175404 de *Solanum demissum* LINDL. conseguimos, sim, provocar lesões locais em forma de manchas necróticas circulares pretas nas folhas inoculadas. (Estampa 21: fig. 8).

O resultado surpreendente destas séries de experiências reside desta maneira no fato de que experimentamos tanta dificuldade em infeccionar batatinhas com um agente infeccioso que nada mais é do que uma variante do vírus Y da batatinha. Vamos voltar a este problema na parte do trabalho dedicada à discussão.

10) *Petunia hybrida* Hort.

Diversas variantes do vírus Y da batatinha foram provadas por autores anteriores de provocar sintomas bastante acentuados de “veinbanding” em *Petunia hybrida*. Também em experiências efetuadas por nós com outras variantes do vírus Y, plantas de *Petunia hybrida* reagiram à infecção com sintomas bastante severos. Mas em diversos dos nossos ensaios (p. e. os de 15-2-54 e 26-11-55) plantas de *Petunia hybrida*, inoculadas com o vírus Piedade, deixaram de exibir sintomas de doença.

Já que era importante para nós verificar, se o vírus de Piedade a este respeito se distingue tão nitidamente das demais variantes do vírus Y, incluímos plantas de *Petunia hybrida* em vários dos nossos ensaios de inoculação por suco e conseguimos nas experiências executadas em 7-12-55 e 21-2-56 induzir sintomas fracos de “veinbanding” em folhas novas de plantas de *Petunia hybrida*, inoculadas com vírus de Piedade. Por suco, prensado destas folhas de *Petunia*, pudemos também transmitir o vírus de Piedade para plantas sadias de espécies indicadoras, p. e. de *Solanum Lycopersicum* ou de *Nicotiana Tabacum*, var. White Burley. Quizemos, porém, ainda verificar, se por enxertia de *Petunia* com garfos severamente infetados de tomateiros, poder-se-iam induzir nos cavalos sintomas mais acentuados de doença. Tais enxertias, num número total de 12, foram executados nos ensaios de 17-12-55 e de 19 e 20-1-56. Os enxertos pegaram bem e as plantas ficaram durante meses em observação. Mas mesmo no caso destas enxertias, algumas plantas de *Petunia hybrida* deixaram de apresentar sintomas, outras exibiram apenas um “veinbanding” fraco nas folhas novas. Por testes de inoculação em espécies indicadoras pudemos também aqui provar que alguns dos cavalos de *Petunia*, enxertados com garfos de tomateiros doentes, de fato, encerravam o vírus de Piedade. Mas em vista do caráter muito brando dos sintomas apresentados por esta espécie e da dificuldade em provocar nela uma infecção com o vírus de Piedade que-remos acreditar, que a espécie *Petunia hybrida* se caracteriza por certo grau de resistência a esta variante do vírus Y da batatinha.

11) *Solanum marginatum* L.

Dispondo de um número muito restrito de plantas desta espécie, pudemos apenas observar que algumas destas plantas inoculadas com o vírus de Piedade, apresentavam um leve mosqueado das folhas novas.

C) Espécies que nos nossos ensaios deixaram de apresentar sintomas da doença causada pelo vírus de Piedade

Reunimos em Tabela III as espécies que nos nossos ensaios não reagiram com sintomas à inoculação com o vírus de Piedade. Indicamos também para cada uma das espécies a data em que ensaios de inoculação com o vírus de Piedade foram executados.

TABELA III
Espécies resistentes ao vírus de Piedade

Família	Espécie	Data da inoculação
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana sylvestris</i> Spegaz & Comes <i>Datura Stramonium</i> L... <i>Solanum melongena</i> L... <i>Solanum variabile</i> Mart. <i>Nicandra physaloides</i> Gaertn.	1-2-54; 13-9-55. 10-10-55; 12-12-55. 10-5-54; 21-7-55; 30-8-55; 9-9-55; 13-9-55. 5-1-56. 14-8-56.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium quinoa</i> .. Willd.	10-4-56.
<i>Amarantaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i> L...	1-2-54; 13-1-56; 24-5-56.
<i>Papilionaceae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L... <i>Vigna sinensis</i> Endl. ...	22-1-54. 22-1-54.
<i>Tropaeolaceae</i>	<i>Tropaeolum majus</i> L...	15-2-54; 27-9-55.
<i>Asclepiadaceae</i>	<i>Asclepias curassavica</i> L.	21-9-55.
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	22-1-54; 15-10-54; 27-9-55.
<i>Compositae</i>	<i>Zinnia elegans</i> Jacqu. ..	19-9-55; 21-9-55.

E' interessante notar que ao grupo das espécies dentro da família das *Solanaceae* que não conseguimos infeccionar com o vírus de Piedade, pertence a espécie *Datura Stramonium*, espécie esta distinguida pela sua resistência ao vírus Y da batatinha.

Além disso, as observações reunidas na tabela III demonstram que todas as espécies de hospedeiras do vírus de Piedade, até agora por nós encontradas, pertencem à família das solanáceas. Em nenhuma das espécies por nós inoculadas com o vírus de Piedade e que se enquadram em famílias diferentes da das solanáceas, conseguimos induzir sintomas que podem ser atribuídos a esse vírus.

D) Observações sobre as qualidades do vírus in vitro

1) Ensaios sobre o ponto termal de inativação.

Efetuamos um total de 12 ensaios para a determinação do ponto termal de inativação do vírus de Piedade. No primeiro destes ensaios, realizado em 12/5/53, dividimos um grupo de 20 tomateiros em 4 lotes. As plantas de um destes lotes foram inoculadas com suco, preparado de maneira usual, de plantas de tomateiro infectadas com o vírus de Piedade. Para a inoculação das plantas dos 3 lotes restantes usamos, porém, porções desse suco, submetidas durante 10 minutos a temperaturas de 80°C, 60°C e 50° respectivamente. Só as plantas inoculadas com o suco submetido a 80°C deixaram de apresentar sintomas, todas as outras porções do suco mostraram-se efetivas. Nas nossas séries subsequentes de ensaios tentamos averiguar qual é, para o vírus de Piedade, a temperatura mínima, em que o agente infeccioso, durante uma exposição in vitro de 10 minutos, é inativado. Nessas séries subsequentes, p. e. naquelas efetuadas em 27/7/54, e em 19/10/54, além de tomateiros também plantas de *Nic. rustica* foram incluídas. Na maioria dos nossos ensaios já sucos submetidos durante 10 minutos a 62°C não provocaram mais sintomas da doença. Em dois dos ensaios, porém, sucos mantidos durante 10 minutos a 62°C mostraram-se ainda ativos e em 1 caso um fraco resultado positivo de infecção foi até obtido com suco submetido durante 10 min. a 64°C. Achamos, por isso, que o ponto termal de inativação do vírus de Piedade está situado entre 61 e 66°C.

2) Ensaios sobre a longevidade do vírus de Piedade.

Em 21/9/55 preparamos um suco de um tomateiro infectado com o vírus de Piedade e dividimos esse suco em 4 porções. A primeira porção serviu para inocular ainda no mesmo dia e de maneira usual duas plantas de *Nicotiana Tabacum* var. White Burley e 4 pés de *Solanum Lycopersicum*. As 3 porções restantes foram distribuídas em ampolas, que foram fechadas e guardadas em luz difusa na

temperatura ambiente. Depois de um intervalo de 24, 48 e 72 horas, uma ampola cada vez foi aberta e com o conteúdo uma inoculação foi efetuada em 2 plantas de fumo e 4 tomateiros.

O resultado desta experiência mostra que só as plantas inoculadas em 21/9/55, quer dizer com o suco recém-preparado, chegaram a exhibir sintomas. A longevidade do vírus de Piedade é por isso menor do que 24 horas.

E) A transmissão do vírus causador da doença de Piedade por insetos

Seguimos nestas experiências a técnica idealizada por WATSON M. A. & ROBERTS F. M. (21, 1939), técnica essa que me foi gentilmente explicada durante uma curta estadia minha, no ano de 1954, na Estação Experimental de Rothamsted. Os afídios, sempre pertencentes à espécie *Myzus persicae* SULZ., antes de ter acesso às folhas doentes, foram mantidos algumas horas em jejum sobre discos humedecidos de papel de filtro em placas de Petri, cobertas de celofane. Depois de um número de horas de jejum correspondente à finalidade da experimentação, grupos de 3 afídios foram retirados da placa de Petri com um pincel desinfetado, e colocados sobre uma folha destacada de planta infetada; já antes de povoar essa folha com afídios, o seu pecíolo tinha sido enfiado em areia húmida esterilizada e posta em pires de barro. Depois de povoar a folha com o pequeno número de afídios, cobria-se a folha com um copo de vidro esterilizado e observava-se com a ajuda de lente de mão em que momento cada um dos insetos começava penetrar com o seu rostró a superfície da folha. Esses momentos foram anotados e o “período de aquisição do vírus” foi controlado por meio de relógio. Passado, para cada inseto individualmente, o “período de aquisição do vírus”, o afídio com o mesmo pincel, com que se fazia a transferência anterior, da caixa de Petri para a folha doente, foi retirado da folha e lançado no fundo de outra caixa de Petri esterilizada. A transferência dos insetos desta caixa para as plantinhas a serem inoculadas se efetuou com um pincel desinfetado, distinto do primeiro. Plantinhas de tomateiro ou de outras espécies indicadoras do vírus de Piedade serviram-nos neste ensaio tanto como fontes de vírus assim como hospedeiras experimentais. Geralmente as plantas a serem infetadas foram povoadas com 5 afídios virulíferos. Outros detalhes da técnica já foram descritos sob o item: Material e Métodos.

Seguindo esta técnica, efetuamos várias séries de experiências (assim p. e. em 13/8/54, 21/9/54) estudando principalmente a in-

fluência da variação do período de jejum ou de “aquisição do vírus” sobre a eficiência da transmissão. Todos os ensaios foram efetuados com a espécie “*Myzus persicae*”.

Verificámos nestes ensaios que afídios que tinham estado durante 3 horas em jejum, transmitiram o vírus com muito maior eficiência do que afídios comparáveis, mas que não tinham passado por período de jejum. Quanto à influência da duração do “período de aquisição de vírus”, averiguamos, que grupos de inséto deixados se alimentar sobre a fonte do vírus durante um prazo de apenas 1/2 minuto, transmitiram o vírus de Piedade com maior eficiência do que grupos comparáveis que tiveram acesso ao vírus durante um prazo de 10 ou 15 minutos. Acreditamos, de acordo com os nossos resultados, que o vírus de Piedade pertence ao grupo dos vírus não persistentes.

DISCUSSÃO

O quadro sintomatológico induzido pelo vírus de Piedade principalmente nas espécies *Nic. Tabacum* e *Nicotiana glutinosa*, a resistência a este vírus demonstrada pela espécie *Datura Stramonium*, as propriedades físicas do vírus in vitro e a maneira em que é transmitido por inséto-vetores, nos levam a admitir que o vírus de Piedade é uma das numerosas variantes, que formam o grupo do vírus Y da batatinha.

Por outro lado, deve-se desde já esclarecer que o vírus de Piedade não é idêntico, em todas as suas propriedades, a nenhuma das variantes do vírus Y, descritas na literatura, mas que possui caracteres que na sua maioria, embora não no mesmo conjunto, já foram encontradas em outras variantes.

Considerando, por exemplo, o vírus de Piedade, primeiramente sob o aspeto dos sintomas que induz em hospedeiras experimentais, podemos facilmente vêr a semelhança entre ele, e os agentes causadores de doenças do tomateiro observadas em Porto Rico (ALVAREZ GARCIA L. A. e ADSUAR J., 1, 1943), em Hawaii (SAKIMURA K., 17, 1953), e em Florida (CONOVER R. A. and FULTON R. W., 5, 1953). Em todos estes casos, os sintomas exibidos por tomateiros eram severos. Além disso, os mencionados autores não tiveram dificuldade em provocar, com os seus agentes infecciosos, sintomas nítidos em plantas de *Nic. Tabacum* e *Nic. glutinosa*, espécies essas que figuram também entre as hospedeiras experimentais do vírus de Piedade. Já achamos, sob este mesmo aspeto, uma maior diferença entre o nosso vírus e o “veinbanding virus” do pimentão descrito por W. T. DALE (8, 1954) em Trinidad. Este último vírus, apesar de representar

provavelmente também uma variante do vírus Y da batatinha, não infetou, nas experiências de DALE, o tomateiro, e provocou sintomas inconspícuos em *Nicotiana rustica* e *Nic. glutinosa*. Também o “veinbanding mosaic virus” do pimentão descrito por SIMONS J. N. (18, 1956) em Florida, que de fato ocasionou sintomas acentuados em *Sol. Lycopersicum*, *Nic. glutinosa* e *Nic. Tabacum*, não parece ser completamente idêntico ao nosso vírus. SIMONS conseguiu com aquele vírus infeccionar plantas de *Zinnia elegans*, espécie esta pertencente às *Compositae*, ao passo que o vírus de Piedade, que neste ponto concorda com as demais variantes do vírus Y da batatinha, descritas na literatura, se mostrou infeccioso apenas para representantes das *Solanaceae*.

Se tentarmos agora comparar o vírus de Piedade com as outras variantes do vírus Y da batatinha do ponto de vista das qualidades físicas in vitro, vamos chegar a uma idéia ligeiramente diferente da posição do vírus de Piedade.

Nos trabalhos clássicos sobre o vírus Y da batatinha, nos quais se baseia p. e. o tratado de K. M. SMITH (10, pg. 348, 1947), atribue-se a este vírus um ponto termal de inativação de 52°C e uma longevidade (em temperatura ambiente) de 24-36 horas.

Nos nossos testes com o vírus de Piedade verificamos que este vírus apresenta uma tolerância maior ao calor, já que o seu ponto termal de inativação se situa entre 61°C e 65°C. Não achamos, porém, dever atribuir grande importância a estas discrepâncias que em parte se relacionam com caracteres das variantes, mas em parte também se explicam por diferenças entre os procedimentos técnicos seguidos pelos diversos pesquisadores.

DARBY J. F., LARSON R. H. e WALKER J. C., que fizeram um estudo comparativo de 25 variantes do vírus Y da batatinha (9, 1951), chegaram à conclusão que ha bastante discrepância entre o ponto termal de inativação das diversas variantes. Algumas já foram inativadas após exposição, durante 10 minutos in vitro a 56°C, ao passo que outras resistiram a uma exposição, durante o mesmo prazo, à temperatura de 61°C.

Procurando, em todo caso, entre as variantes do vírus Y, descritas na literatura, aquelas que a respeito do ponto termal de inativação se assemelham mais ao vírus de Piedade, podemos destacar aqui o vírus do “veinbanding mosaic” do pimentão, descrito por SIMONS J. N. (18, 1956) que possui um ponto termal de inativação entre 60°C e 65°C, quer dizer bem comparavel ao do vírus de Piedade. O ponto termal de inativação do vírus de tomateiro em Hawaii, obser-

vado por SAKIMURA K. (17, 1953), virus este que achamos a respeito do quadro sintomatológico induzido nas principais espécies hospedeiras bem parecido com o nosso virus, já possui um valor inferior ao do virus de Piedade, situando-se entre 53°C e 56°C. Ligeiramente mais próximo do valor correspondente ao nosso virus seria o do ponto termal de inativação do virus causador da já mencionada doença de virus de pimentão e de tomateiro em Porto Rico, que, de acordo com os resultados obtidos por ROQUE A. e ADSUAR J. (16, 1941), está situado entre 55°C e 58°C.

Acho que esses poucos exemplos bastam para demonstrar, que as discrepâncias que encontramos em alguns caracteres entre o virus de Piedade e outras variantes do virus Y da batatinha, não passam da ordem de grandeza das diferenças existentes entre variantes desse virus já descritos na literatura.

Não vamos nos referir aqui à comparação das variantes, baseada no caráter longevidade do virus in vitro, por dispôr, com relação ao virus de Piedade, de um número relativamente reduzido de testes sobre esta qualidade. Achamos também que uma comparação objetiva entre testes de longevidade, executados por diversos autores e sob condições externas variáveis, oferece grandes dificuldades.

Em lugar disso queremos destacar aqui dois caracteres do virus de Piedade que ao nosso ver são especialmente distintivos: i. é. a capacidade de induzir sintomas de retorcimento em tomateiros e a dificuldade de infeccionar a batatinha.

Quanto ao sintoma de “retorcimento” (twisting) das folhas de tomateiro provocado pelo virus de Piedade, não encontramos na literatura relativa a doenças de tomateiro, causadas por variantes do virus Y, nenhuma menção de sintomas exatamente iguais. A figura de tomateiro doente, inserida no trabalho de ALVAREZ GARCIA L. A. e ADSUAR J. (1, 1943) representa antes sintomas de uma Clorose intensa e de um acanoamento das folhas do que os de um retorcimento dos folíolos. CONOVER R. A. e FULTON R. W., (5, 1933) descrevendo a doença do tomateiro na Florida, referem-se a um leve enrolamento das folhas e à inclinação das suas pontas para baixo, mas mostram nas suas figuras a ocorrência de severas necroses, que nunca nas nossas experiências com o virus de Piedade pudemos observar. Finalmente SIMONS N. J. (18, 1956) na sua descrição muito sucinta dos sintomas que o “veinbanding mosaic virus” do pimentão, observado na Florida, causa em tomateiros, refere-se apenas a um leve mosqueado e acanoamento (cupping), mas não a um retorcimento (twisting) dos folíolos. Como já mencionámos anteriormente, algumas

variantes do vírus Y, descritas na literatura, não manifestam nenhum efeito no tomateiro ou induzem sintomas quase imperceptíveis. Queremos, por isso, considerar o sintoma acentuado de retorcimento dos folíolos do tomateiro, demonstrado pelo vírus de Piedade, bem característico desta variante do vírus Y da batatinha, explicável talvez como resultado de uma adaptação do vírus ao tomateiro.

Enquadrar-se-ia, possivelmente, na mesma hipótese o fato interessante que experimentamos tanta dificuldade em infeccionar batatinhas das mais diversas variedades com o vírus de Piedade. É verdade que já autores anteriores se referem à resistência, que certas variedades de batatinha e "seedlings" de híbridos, apresentam contra algumas variantes do vírus Y da batatinha. No trabalho de DARBY, LARSON e WALKER (9, 1951) encontram-se exemplos da resistência de variedades americanas de batatinhas contra algumas das variantes do vírus Y por eles estudadas e MUNRO J. (15, 1954) no seu trabalho sobre variantes do vírus Y da batatinha e o seu comportamento a variedades de batatinha, até apresenta uma figura de um "seedling" de batatinha que resistiu à infecção com uma variante do vírus Y, contra a qual "seedlings" de outra origem mostraram-se bem suscetíveis.

No nosso caso é apenas surpreendente que um número tão grande de variedades de batatinha e de híbridos entre variedades resistiu ao ataque pelo vírus de Piedade. Escolhemos para as nossas experiências com preferência variedades de batatinha conhecidas como suscetíveis ao vírus Y da batatinha, assim como Ackersegen, Bona e Olympia. Deve-se ainda levar em consideração o fato de que lançamos mão de 3 diversos métodos de inoculação de *Solanum tuberosum* com o vírus de Piedade e que mesmo o método de enxertia nestas experiências não conduziu a resultados positivos com a exceção dos sintomas locais que conseguimos induzir em uma das seleções de *Solanum demissum*. Do conjunto dos nossos resultados acreditamos poder tirar a conclusão que o vírus de Piedade é uma variante do vírus Y, dotada de pouca ou nenhuma capacidade de infeccionar a espécie *Solanum tuberosum*.

Ao nosso ver, já o fato em si que uma variante de um vírus que se tornou conhecido pelos efeitos prejudiciais que provoca em batatinha, não se mostra infeccioso para esta mesma espécie, é bastante surpreendente. Mas do ponto de vista prático, estas observações adquirem ainda uma importância suplementar, porque elas fornecem esclarecimentos úteis para a identificação de novos vírus. Queremos demonstrar isso num exemplo.

FERNANDEZ VALIELA M. V. (11, pg. 60, 1954) descreveu um vírus, que originalmente se manifestou de maneira espontânea em batatinha, e que foi transmitido por ele experimentalmente para *Physalis angulata*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana Tabacum*, *Solanum Lycopersicum*, mas que deixou de infeccionar *Datura Stramonium*. As qualidades físicas do vírus in vitro, determinadas também por FERNANDEZ VALIELA, lembram as do vírus Y da batatinha. Mas não se conseguiu, nem por meio de suco, nem de enxertia nem do inseto-vetor, transmitir o vírus para batatinha das variedades Up to date, Majestic e Katahdin. No trabalho citado, o autor deixa aberta a questão da identificação definitiva desse vírus.

Nesta conexão queremos nos referir aqui também ao aparecimento, nas zonas de produção do fumo, na Alemanha, de uma nova doença, causada por uma variante do vírus Y da batatinha. Esta doença é mencionada no trabalho de HÄRLE A. (13, 1955, pg. 12). Dr. O. BODE, a quem por carta devo esclarecimentos suplementares a respeito dessa doença, acentua o fato de que a variante em questão induz sintomas bastante severos em fumo, mas fica completamente latente em certas variedades de batatinha. ⁽¹⁾

A resolução de tais casos poderá ser facilitada futuramente pelas nossas observações que demonstram a existência de variantes do vírus Y da batatinha, que em numerosas variedades de batatinha deixam de induzir sintomas.

A TOMATO-DISEASE FROM PIEDADE, CAUSED BY POTATO-VIRUS Y.

1) *From tomato fields in the neighborhood of Piedade (State of São Paulo, Brasil) we received samples of plants, displaying a clearing of the veins of their apical leaves. On these leaves, which were smaller than those of healthy plants, the leaflets were narrow and the veins enlarged.*

2) *By performing inoculation experiments in healthy plants of several indicator species in the greenhouses of the "Instituto Biológico" in São Paulo, we found out, that the causal agent of the disease of Piedade is a virus, transmissible by grafting, sap, and by means of the insect-vector *Myzus persicae* SULZ.*

3) *Seedlings of tomatoes, inoculated in the greenhouse mechanically with the virus of Piedade on their expanded leaves, about two weeks after the inoculation show distortions of the blade of the apical leaves and a twisting of the leaftips. (fig. 1 plate 18).*

(1) Num trabalho recente (*Phytopath. Zschr* 23: 328-334, 1955) também Köhler E. alude à esta propriedade da nova variante do vírus Y da batatinha.

Besides, the leaves of tomato-plants systemically infected with Piedade-virus are shorter than those of healthy plants, since on such leaves the leaflets are very close to each other. Tomato plants, which a few months before had been inoculated with the Piedade-virus, may show only slight symptoms on the apical leaves. But on such plants the older or the medium leaves often show distortions. (fig. 3 plate 19).

4) In seedlings of *Nicotiana rustica*, the Piedade virus induces very severe systemic symptoms, consisting in malformation of the young leaves and in "veinbanding", which later on develops into a pronounced "blistering" (fig. 4 plate 19).

Similar systemic symptoms may be observed also on young leaves of plants of *Solanum ciliatum*, the older leaves of which had been inoculated with the Piedade - virus. (fig. 6 plate 20).

5) Relatively mild symptoms of the type of "veinbanding" are induced by the Piedade-virus on the young leaves of inoculated plants of *Nicotiana Tabacum*, var. White Burley (fig. 7 plate 21), *Nic. glutinosa* and *Petunia hybrida*. Seedlings of *Capsicum annuum*, when inoculated very young, may show severe necrosis of the leaves, followed by leaf-drop. Older plants of the same species after inoculation with the Piedade-virus display only mild symptoms of "veinbanding" (fig. 5 plate 20).

6) We did not succeed in infecting test plants of *Datura Stramonium* with Piedade-virus. We also failed in all our tentatives to infect plants belonging to a family other than that of the Solanaceae. (table III).

7) The thermal-inactivation-point of the Piedade-virus is situated between 61°C and 66°C. In our rather limited series of experiments the virus resisted less than 24 hours to ageing in vitro at room temperature.

8) In our inoculation experiments with the insect vector *Myzus persicae* the non-viruliferous aphids after a fasting period of 3 hours were able to acquire the virus within 10-30 seconds. According to these experiments, the causal agent of the Piedade-disease belongs to the group of non-persistent viruses.

9) All these observations lead us to the conclusion, that the Piedade-virus is a strain of the potato-Y-virus. It differs from other strains of this same virus described in the literature, by the severe and peculiar symptoms (leaf "twisting"), which it induces in tomatoes, and by its lack of infectivity against potato plants.

10) To learn more about the behavior of the causal agent of the Piedade disease with regard to the species *Solanum tuberosum*, we performed a rather large number of experiments, trying to infect potato plants by grafting, sap inoculation or by means of the insect-vector *Myzus persicae*. For the first group of experiments, listed in table I, we choose potato plants of several varieties, grown from tubers, and proved by previous tests to be free from sap-transmissible viruses. None of the potato plants inoculated in these experiments with Piedade-virus showed symptoms and no virus could be recovered from the inoculated potato plants by inoculation tests in indicator species.

In additional series of experiments (see Table II), seedlings of several commercial potato varieties and of crosses between varieties were inoculated with Piedade-virus. Also in these experiments until now none of the inoculated plants of *Solanum tuberosum* showed symptoms or could be shown, by posterior inoculation experiments in indicator species, to contain Piedade-virus.

On the other hand the Piedade-virus produced local symptoms in the form of black necrotic circles on the inoculated leaves of seedlings of *Solanum demissum*, selection PI 175404 (IRI, Potato Introduction Project, Genetic Department, University of Wisconsin, Madison, U. S. A.) (fig. 8, plate 21).

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ GARCIA L. A. & ADSUAR J. — 1943 — Studies on tomato mosaic in Puerto Rico. *Jl. of Agric. Univ. of Puerto Rico*. 24: 141-148.
2. BLENCOWE J. W. & CALDWELL J. — 1946 — A new virus disease of tomatoes. *Nature* 158: 96.
3. BRIERLEY Ph., SMITH F. F. & DOOLITTLE S. P. — 1953 — Experiments with tomato aspermy virus from Chrysanthemum. *Phytopath.* 43: 404.
4. CIFERRI R. — 1951 — Gli "scopazzi": Una virosi del pomodoro affine alla "aspermia" del pomodoro in Italia. *Notiz. Malattie Plante* 16: 16-20 (*Biol. Abstr.* 1953, 27: 234).
5. CONOVER R. A. & FULTON R. W. — 1953 — Occurrence of potato Y virus on tomatoes in Florida. *Plant Dis. Rept.* 37: 460-462.
6. COSTA A. S. — 1949 — Duas novas moléstias de virus do tomateiro em São Paulo. *O Biológico* (S. Paulo) 15: 79-81.
7. COSTA A. S. & ALVES S. — 1950 — Mosaico do pimentão. *Bragantia* 10: 95-96.
8. DALE W. T. — 1954 — Sap-transmissible mosaic diseases of solanaceous crops in Trinidad. *Ann. appl. Biol.* 41: 240-247.

9. DARBY J. F., LARSON R. H. & WALKER J. C. — 1951 — Variation in virulence and properties of potato virus Y strains. *Research Bulletin* 177, *University of Wisconsin*, 32 pp.
10. FERGUSON I. A. C. — 1951 — Four virus diseases of solanaceous plants in Trinidad. *Plant Dis. Reporter* 35: 102-105.
11. FERNANDEZ VALIELA M. V. — 1954 — Un virus, que se cree aun no determinado, hallado en papa procedente de San Luis. Segunda Reunion de Papa, Pergamino (Rep. Argent.) 60-61.
12. GIGANTE R. — 1940 — L'incurvamento apicale del pomodoro. *Boll. R. Staz. Patol. Veg.* 20: 231-250. (*Biol. Abstr.* 1949, 23: 2577).
13. HÄRLE A. — 1955 — Die wichtigsten Krankheiten und Beschädigungen an Kulturpflanzen im Bereich der Bundesrepublik Deutschland im Anbaujahr 1954 (Oktober 1953 bis Oktober 1954). *Beil. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst.* 7: 1-19.
14. MAC NEILL B. H. — 1955 — Some viruses of the field tomato in Ontario. *The Plant Disease Rept.* 39: 191-193.
15. MUNRO J. — 1954 — Strains of potato virus Y in relation to potato varieties. Proc. II. conf. potato virus diseases Lisse Wageningen 1954: 102-106.
16. ROQUE A. & ADSUAR J. — 1941 — Studies on the mosaic of peppers (*Capsicum frutescens*) in Puerto Rico. *J. Agri. Univ. P. R.* 25: 40-50. (*R. appl. Myc.* 21: 401, 1942).
17. SAKIMURA K. — 1953 — Potato virus Y in Hawaii. *Phytopath.* 43: 217-218.
18. SIMONS J. N. — 1956 — The pepper veinbanding mosaic virus in the everglades area of South Florida. *Phytopath.* 46: 53-57.
19. SMITH K. M. — 1937 — A textboock of plant virus diseases. J. & A. Churchill Ltd. London 615 pp.
20. VASUDEVA R. S. & SAM RAJ J. — 1947 — A latent virus in tomato. *Current Sci.* 16: 348-370.
21. WATSON M. A. & ROBERTS F. M. — 1939 — A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus* virus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz.), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proc. Roy. Soc. B.* 127: 543-576.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 18

Fig. 1, Planta nova de *Sol. Lycop.* var. Santa Cruz, inoculada 24 dias antes com o virus de Piedade, mostrando retorcimento de folíolos das fôlhas novas.

Fig. 2, Planta nova, sadia, de *Sol. Lyc.* var. Santa Cruz.

Estampa 19

Fig. 3, *Sol. Lyc.*, var. Santa Cruz, inoculada 42 dias antes por suco com o vírus de Piedade, exibindo distorção de folhas médias.

Fig. 4, Malformação e bolhosidade ("blistering") em folhas novas de *Nicotiana rustica*, inoculada 78 dias antes por suco com o vírus de Piedade.

Estampa 20

Fig. 5, Planta de *Capsicum annuum*, inoculada 42 dias antes com o vírus de Piedade, apresentando nas folhas novas faixas escuras ao longo das nervuras ("veinbanding") e rugosidade do limbo.

Fig. 6, Planta nova de *Solan. ciliatum*, apresentando deformação de folhas novas (Nervuras secundárias em forma de "leque") e bolhosidade, 34 dias após a inoculação das folhas velhas com suco contendo vírus de Piedade.

Estampa 21

Fig. 7, Folha de planta de *Nicotiana Tabacum*, White Burley, apresentando perto do bordo sintomas de "veinbanding", 62 dias após inoculação da planta, por suco, com vírus de Piedade.

Fig. 8, Planta de *Solanum demissum*, apresentando placas anulares, necróticas, pretas, nas folhas inoculadas 17 dias antes por suco com o vírus de Piedade.

Todas as fotografias foram tiradas pelo Snr. Vicente Forster da Seção de Fotografia.





Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

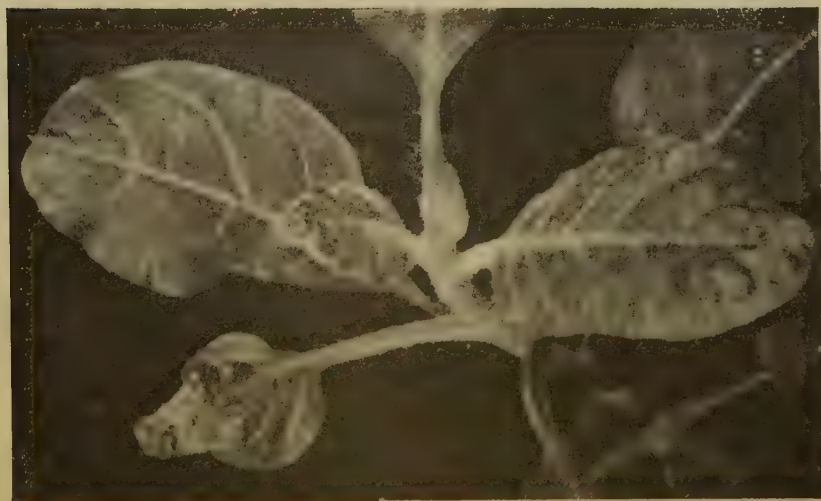


Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

O BACTÉRIO CAUSADOR DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEEIRO

POR

Julio Franco do Amaral

do Instituto Biológico de S. Paulo

Cyro Teixeira

do Instituto Agrônômico de Campinas

Edyl D. Pinheiro

do Instituto Biológico de S. Paulo

1 — INTRODUÇÃO

Em dias de dezembro de 1955, os colegas A. S. COSTA e COARACY M. FRANCO, trouxeram ao Dr. A. P. VIÉGAS, da Secção de Fitopatologia do Instituto Agrônômico de Campinas, ramos de cafeeiro procedentes de Garça, Est. S. Paulo, exibindo fôlhas ainda frescas e nas quais se observavam lesões pardas com larga borda amarela. O Dr. VIÉGAS, interpretou o caso como sendo deficiência de potássio, com o que os colegas A. S. COSTA e COARACY M. FRANCO não concordaram, porque em lesões de carência de potássio, não há de ordinário halo amarelo.

Foram feitos cultivos em meios comuns de agar batatinha-glicose e caldo simples a partir dêsse material, junto à Secção de Fitopatologia do Instituto Agrônômico, e exames microscópicos correspondentes, pelo Dr. VIÉGAS. Dos cultivos isolaram-se bactérios saprófitos e semi-saprófitos. O exame microscópico do material fresco, em vermelho Congo, revelou a existência de talos bacterianos. Também, no mesmo laboratório em Campinas, as primeiras inoculações foram executadas empregando-se de início: 1) suspensão bacteriana em água destilada obtida pelo esmagamento de tecidos foliares; 2) puncturas de fôlhas afetadas fazendo com que as picadas ferissem fôlhas sadias de sob o limbo afetado. Passados dez dias mais ou menos, o Dr. VIÉGAS em companhia de A. S. COSTA, constataavam as primeiras lesões obtidas por inoculação: as manchas eram pardacentas e apresentavam largo halo amarelo como nas fôlhas colhidas no campo, em Garça. Dêsse ensaio preliminar, ficou provada a natureza parasítica da moléstia. As inoculações feitas com cultivos puros dos vários bactérios que o Dr. VIÉGAS isolara, das lesões, não reproduziram os sintomas observados em campo. O bactério patogênico, de mais lento crescimento, e mais exigente, era facilmente dominado

por bactérias saprófitos e semi-saprófitos que o acompanhavam. Foi quando o primeiro autor dêste trabalho, de passagem casual por Campinas, recebeu das mãos do Dr. VIÉGAS, folhas infectadas por meio de puncturas que apresentavam sintomas típicos da moléstia, bem como lâminas permanentes coloridas pela hematoxilina férrica. A partir das folhas, isolou uma espécie de *Pseudomonas*, que em ensaios de inoculação realizados, agora no Instituto Biológico, em São Paulo, repetiu exatamente as lesões constatadas em campo. Ficou assim provada a natureza bacteriana da moléstia às folhas do cafeeiro. Também o bactério foi reisolado e reinoculado e os cultivos comparados com os iniciais provando-se assim os postulados de Koch.

Depois também, em Campinas o Dr. VIÉGAS conseguiu isolar o mesmo bactério patogênico e executar para mais de 6.000 inoculações em folhas de tôdas as espécies, variedades, etc., de *Coffea* existentes junto à Secção de Genética do Instituto Agrônômico, e isto por nímia gentileza do colega ALCIDES CARVALHO. As plantas foram inoculadas com suspensão aquosa do bactério patogênico, por injeccção. As inoculações por aspersão não deram resultados satisfatórios. Tôdas as inoculações foram efetuadas durante o mês de fevereiro, quando a temperatura média do ar foi de 23°C. Também cerca de 1.000 frutos de *Coffea arabica* L. foram inoculados com cultivos puros do bactério pelo Dr. VIÉGAS.

Distribuição geográfica do organismo: Em virtude da importância econômica que a moléstia poderia assumir à agricultura do Estado, o Dr. VIÉGAS se pôs em contacto com centros fitopatológicos onde provavelmente a enfermidade pudesse ter sido já constatada, enviando aos especialistas dêsses centros, não sòmente fotografias, mas material afetado e culturas puras do bactério. Ficou mais ou menos estabelecido que o bactério não fora constatado ainda nem em África ou Ásia, havendo êle surgido causando moléstia de proporções alarmantes na região de Garça, do Est. S. Paulo.

2 — ETIOLOGIA

O organismo causador da moléstia (“mancha aureolada” do cafeeiro como a denominaram A. S. COSTA e outros) é um bactério do gênero *Pseudomonas* Migula. Em cultura em meio de peptona e extrato de carne, o bactério se apresenta sob a forma de pequenos bastonetes isolados, ou em cadeias curtas. Sua mobilidade pode ser observada em gota pendente. É lofótrico (corante de Zettnow, modif. Bougert). Cora-se fácilmente pelas anilinas. É Gram-negativo, não apresentando cápsula (Hiss) nem esporos (Dorner).

Caracteres culturais: Não é fluorescente. Depois de 48 horas nota-se o aparecimento, em meio de peptona-extrato de carne, de colônias de 2 a 3 mm. de diâmetro, circulares, convexas, de cor cinza clara, com bordas regulares, butirosas e sem cheiro, superfície lisa.

Gelatina — liquefaz

Caldo simples — turvação, sem formação de película

Amido — não hidroliza (caldo simples mais amido solúvel a 0,02%)

Indol — não produz indol (prova em água de peptona, 7 dias a 28°C)

Nitratos — negativo (água nitrada - 5 dias a 27°C - Tittsler)

H²S — negativo (ágar chumbo, 7 dias a 28°C)

Amônia — negativo (água de peptona, 7 dias a 28°C)

Leite-tornassol — alcaliniza, com posterior formação de sôro

Batatinha — bom crescimento sem pigmentação

Açúcares — não fermenta (acidez ou gás): maltose, glicose, rafinose, sacarose, lactose, arabinose, galactose, xilose e levulose, mas se desenvolve bem nêles com reação alcalina.

Glicerina, salicina, inositol e manitol — não são fermentados

Temperatura ótima — ao redor de 30 - 35°C

Fonte — Isolado de lesões em folhas de *Coffea arabica* L.

Suscetíveis — Constatado *in natura*, em folhas, ramos novos, frutos, brácteas de *Coffea arabica* L.; produz mancha aureolada nas seguintes espécies: *Coffea eugenoides* MOORE, *Coffea dewevrei* DE WILD. et DUR. *Coffea excelsa* A. CHEV., *Coffea arabica* L. var. *mokka* HORT. EX CRAMER, var. *San Ramón*, *Mundo Novo*, *Amarelo de Botucatú*, e linhagens:

Bourbon amarelo

C J 2-16; *C J* 3-3; *C J* 3-4; *C J* 3-5; *C J* 9-12; *C J* 11-16; *C J* 14-8; *C J* 18-7; *C J* 19-4 e *C J* 20-9

Mundo Novo

C P 382-2; *C P* 382-9; *C P* 387-1; *C P* 388-18; *C P* 403-11; *C P* 403-14 e *C P* 403-17

J P 378-2 e *J P* 380-4

P 376-3; *P* 378-1; *P* 385-20; *P* 388-1 e *P* 391-12

M P 379-12 e *M P* 388-6

R P P 381-13

L C P 379-19

Causa requeima das folhas a *Citrus* sp., *Solanum tuberosum* L., *Lycopersicon esculentum* MILL., *Solanum paniculatum* L. var. *acutilobum* SENDT., *Phaseolus vulgaris* L., *Ligustrum lucidum* AIT., *Olea europaea* L.

3 — PATOGENICIDADE PARA FRUTOS DO CAFEIEIRO

Como o bactério poderia afetar os frutos do cafeeiro, reduzindo a produção, o Dr. VIÉGAS executou ensaios de inoculação, cujos resultados vão sumariados, no quadro I.

QUADRO I

Ensaio de inoculação de frutos de cafeeiro em diversos estágios de desenvolvimento.

Frutos	Inoculados			Testemunhas		
	+	—	Totais	+	—	Totais
Grandes ...	32	142	174	4	35	39
Médios	215	267	482	16	88	104
Pequenos ..	121	17	138	6	51	57

A análise dos resultados obtidos pelo Dr. VIÉGAS demonstra que os frutos pequenos, em estágio inicial de desenvolvimento, são muito mais suscetíveis à moléstia do que aqueles já bem desenvolvidos.

4 — NOME DO PATÓGENO

Se aplicarmos os dados culturais, da tabela do *Manual de Bergey*, 6.^a ed., à pg. 82, verifica-se que o bactério cai próximo de *Pseudomonas fabae* YV. BULL, mas difere desta espécie por não formar película em caldo simples, não produz indol, não reduz nitratos e o amido não é hidrolizado. Por outro lado, *P. andropogoni* (E. SMITH) STAPP. é diferente porque produz colônias brancas, crescimento lento em caldo simples com formação de ligeira película; forma ácidos a partir dos açúcares e o amido é parcialmente digerido, estando a temperatura ótima entre 22-30°C, sendo patogênico a *Sorghum vulgare* PERS, *Gramineae*. *P. woodsii* (E. SMITH) STEVENS forma ácidos a partir dos açúcares, e assim se afasta do material isolado do cafeeiro. *P. astragali* TAKIMOTO produz ácido sulfídrico, o que não acontece com a espécie isolada de *Coffea*. *P. syringae* VAN HALL provoca fluorescência dos meios de cultura, o que não se dá com o material isolado do cafeeiro, embora o largo número de plantas susceptíveis a *P. syringae* VAN HALL pareça indicar tratar-se desta espécie.

Assim, a espécie ora isolada de cafeeiro ao que parece, se nos afigura nova, e à qual propomos o nome de *Pseudomonas garcae* n. sp.

THE BACTERIAL AGENT OF THE "MANCHA AUREOLADA" OF THE COFFEE-PLANT

A b s t r a c t

The "mancha aureolada" of the coffee plant is a bacterial disease inducing necrotic lesions surrounded by yellow halo on coffee-leaves.

The same causal agent induces also necrotic symptoms on leaves of *Citrus* sp., *Solanum tuberosum* L., *Lycopersicon esculentum* MILL., *Solanum paniculatum* L. var. *acutilobum* SENDT. *Phaseolus vulgaris* L., *Ligustrum lucidum* AIT. and *Olea europea* L.

Morphology: The "mancha aureolada" is caused by a bacterium of the genus *Pseudomonas* MIGULA.

Cultivated on nutrient agar the bacterium consists of small rods isolated or in short chains. Its mobility may be observed in the hanging drop. It is lophotrichous. It stains easily with anilin dyes; it is gram-negative and presents neither capsules nor spores.

Character of the culture: It is not fluorescent. After cultivating the bacterium for 48 hours in nutrient agar we may observe round, convex, clear-greyish colonies of 2-3 mm diameter. They are butyraceous, have a regular border and a smooth surface; they do not exhale any odor. Tests H_2S and ammonia were negative. The bacterium shows good growth in sugars but produces, no fermentation. Optimum temperature: 30-35°C.

Source: isolated from leaf-lesions of *Coffea arabica* L.

BIBLIOGRAFIA

- BREED, R. S. et al - 1948 - Bergéys Manual of Determinative Bacteriology. 6.^a edição pgs. 82-150. The Williams & Wilkins Company - Baltimore U. S. A.

ROTHSCHILD LOUREIRO — SÃO PAULO

SÃO PAULO
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua Brigadeiro Tobias, 647-653
1957